

Aus dem Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Etablierung biochemischer Marker für Diagnostik und Prognose
caniner Mammatumore**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von

Ole Lamp
aus Kiel

Leipzig, 2012

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Prof. Dr. Almuth Einspanier

Gutachter: Prof. Dr. Almuth Einspanier

Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut

der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Claudia Binder

Abteilung Hämatologie und Onkologie

der Universitätsmedizin Göttingen,

Georg-August-Universität, Göttingen

Tag der Verteidigung: 24.04.2012

Meiner Frau und unserem Sohn

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	4
2.1	Mammatumoren	4
2.1.1	Definition	4
2.1.2	Epidemiologie	4
2.1.3	Ursachen	5
2.1.4	Diagnostik	5
2.1.5	Biologisches Verhalten und Prognose	7
2.1.6	Therapie	8
2.2	Ausgewählte Einflussfaktoren bei CMT-Erkrankungen	9
2.2.1	Sexualsteroidhormone	9
2.2.1.1	Östrogene	9
2.2.1.2	Progesteron	10
2.2.2	Relaxin	11
2.2.2.1	Die Relaxin-Peptidfamilie	11
2.2.2.2	Aufbau und Syntheseorte	12
2.2.2.3	Physiologische Wirkungen	12
2.2.2.3.1	Relaxin im Reproduktionsgeschehen	12
2.2.2.3.2	Relaxinwirkungen außerhalb des Reproduktionstraktes	13
2.2.2.4	Pathologische Effekte des Relaxins	14
2.2.2.5	Relaxinrezeptoren	15
2.2.2.5.1	Lokalisation, Struktur und Funktion von RXFP1 und RXFP2	16
2.2.2.5.2	Regulation der RXFP-Signalintensität und -dauer	17
2.2.2.5.3	klinische Anwendung der Relaxinrezeptoren	19
2.2.2.6	Alternative Relaxinbindungsstellen	19
2.2.3	Matrix-Metalloproteinasen	20
2.2.3.1	Regulation der Synthese und Aktivität der MMP	20

2.2.3.2	MMP in caninen Mammatumoren	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Publikation 1: Investigation of the Local Expression of the Relaxin System in Canine Mammary Tumours	23
3.2	Publikation 2: The metastatic potential of canine mammary tumours can be assessed by mRNA expression analysis of connective tissue modulators	30
4	Diskussion	47
5	Zusammenfassung	56
6	Summary	58
7	Literaturverzeichnis	60
8	Anhang	I
8.1	Abstract zu dem Vortrag auf dem 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction in Wien, 9.-11. Juli 2008	I
8.2	Abstract zu einem Poster, vorgestellt auf dem 7. Leipzig Research Festival for Life Sciences, 12. Dezember 2008	III
8.3	Abstract zu dem Vortrag auf der 18. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie in Leipzig, 9.-11. März 2008	V
	Danksagung	
	Tabellarischer Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC2	Adenylatzyklase 2
Arg	Arginin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches 3'-5' Adenosinmonophosphat
CMT	caniner Mammatumor
Da	Dalton, U
ECM	Extrazelluläre Matrix
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
EMMPRIN	Extrazellulärer Matrix-Metalloproteinasen Induktor
engl.	englisch
ER	Östrogenrezeptor
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
GH	Wachstumshormon, Growth hormone
G-Protein	Guanin-Nucleotidbindendes Protein
G _s -Protein	stimulatorisches Guanin-Nucleotidbindendes Protein
GR	Glucocorticoidrezeptor
Ile	Isoleucin
INSL	Insulin-like factor
IP3	Inositol-3-Phosphat
IUPHAR	International Union of Pharmacology
LDLa	low-density lipoprotein receptor type A
LGR	leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor
LRR	leucine-rich repeats
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinasen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
MT-MMP	Membrantyp-Matrix-Metalloproteinase
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
n	Anzahl

NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion / Real-time PCR
RLN	Relaxin, Bezeichnung der Relaxingene
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptions- Polymerase-Kettenreaktion
RXFP	relaxin family peptide receptor
siRNA	short interfering RNA
Suppl.	Supplement, Ergänzungsband
TIMP	Gewebe-Inhibitor der Metalloproteinasen
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Val	Valin
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. vascular endothelial growth factor)
%	Prozent

1 Einleitung

Mammatumoren sind neben Hauttumoren die hauptsächliche Tumorerkrankung des Hundes (RUTTEMAN 2005) und stellen eine der Haupttodesursachen für Hündinnen dar (SIMON et al. 2001). In verschiedenen Studien war ein Anteil von 46% bis 68% der diagnostizierten Tumoren maligne und damit potentiell lebensbedrohlich für den Patienten (FIDLER und BRODEY 1967; DORN et al. 1968; MACVEAN et al. 1978; PRIESTER 1979; BRODEY et al. 1983; ALLEN und MAHAFFEY 1989; HELLMEN et al. 1993; SIMON et al. 1996). Diese malignen Tumoren wachsen häufig invasiv in das umgebende Gewebe ein und neigen in 10% bis 50% der Fälle zur Metastasierung über Lymph- oder Blutbahnen in lebenswichtige Organe (BOSTOCK 1975; CLEMENTE et al. 2010). Dabei sind von der Metastasierung vorwiegend die Lunge, aber auch Niere, Leber und andere zentrale Organe wie beispielsweise Gehirn und Herz betroffen (CLEMENTE et al. 2010). Neben den zum Zeitpunkt der Diagnose schon als maligne einzustufenden caninen Mammatumoren (CMT) geht auch von den noch als benigne anzusehenden Neoplasien der Mamma eine Gefahr aus, wenn Sie im Patienten belassen werden. Möglicherweise stellt der benigne Tumor lediglich eine Vorstufe zur malignen Transformation dar und kann sich in einem noch unbekannten Zeitrahmen zum malignen CMT entwickeln (SORENMO et al. 2009). Da bei den in der Körperperipherie wachsenden CMT nicht der Primärtumor, sondern die Metastasen die eigentliche Gefahr für das Überleben des Patienten darstellen, zielt die übliche chirurgische Therapie darauf ab, den Primärtumor vor der Absiedlung von Tumorzellen in innere Organe und Lymphknoten zu entfernen (NOVOSAD 2003). Im Fall von malignen Tumoren kann diese Metastasierung bereits erfolgt sein und die chirurgische Therapie allein nicht ausreichen, so dass auch auf dem medikamentellen Weg die verbliebenen Tumorzellen bekämpft werden müssen (NOVOSAD 2003).

Welche therapeutischen Maßnahmen zu einem bestimmten Zeitpunkt noch die Überlebenszeit verlängern können und von den Patientenbesitzern gewünscht werden, hängt sehr stark von der exakten Diagnose, der daraus abgeleiteten Prognose sowie den Behandlungskosten ab.

Bisherige Diagnoseverfahren zum Nachweis von Metastasierung oder Metastasierungsneigung wie die röntgenologische Untersuchung, Computertomographie und Histologie haben nur eine begrenzte Aussagekraft. So kann die Röntgendiagnostik der Lunge erst das Vorliegen von Lungenmetastasen ab einer Größe von 3 mm (SUTER et al. 1974) nachweisen. Dies hat zur Folge, dass eine Beteiligung der Lungen oft erst spät festgestellt werden kann.

Einleitung

Die histologische Untersuchung kann lediglich bestehende Metastasen in Lymphknoten oder invasives Wachstumsverhalten eines chirurgisch entfernten Primärtumors feststellen.

Allerdings ist das Fehlen von Lymphknotenmetastasen kein sicheres Zeichen dafür, dass noch keine Fernmetastasen vorliegen, da auch eine hämatogene Streuung von CMT möglich ist (HELLMEN et al. 1993). Das invasive Wachstumsverhalten eines Tumors hingegen gibt lediglich einen Hinweis dafür, dass Tumorzellen streuen könnten, nicht aber, ob sie auch wirklich am Zielort anhaften und zu einer Metastase heranwachsen.

Andere etablierte Methoden zur Erstellung einer Prognose für CMT-Patienten wie die TNM-Klassifikation (OWEN 1980), die Einteilung der Tumortypen nach MISDORP et al. (1999) oder verschiedene Gradingssysteme (GILBERTSON et al. 1983; KURZMAN und GILBERTSON 1986; SIMON et al. 2001; KARAYANNOPOULOU et al. 2005) erlauben aufgrund von Studien eine Schätzung der mittleren Überlebensdauer, nicht aber eine spezielle Aussage über die Existenz von Metastasen oder das metastatische Potential.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit (LAMP et al. 2011) eine Methode auf der Basis tumoreigener Faktoren zu etablieren, die möglichst sicher und frühzeitiger als andere Methoden eine Metastasierung oder metastatisches Potential anzeigen können. Die Untersuchung dieser Faktoren sollte auch präoperativ möglich sein, um so eine bessere Abschätzung des für eine Heilung notwendigen Therapieaufwandes zu erreichen.

Von besonderem Interesse war dabei das Peptidhormon Relaxin, da es bei Brustkrebspatientinnen ein ergänzender Marker für Metastasierung ist (BINDER et al. 2004). Relaxin kann über seine Rezeptoren in verschiedenen Studien die Invasivität von humanen, caninen und murinen Mammatumorzellen fördern (BINDER et al. 2002; SILVERTOWN et al. 2003; HABLA 2010).

Invasives Verhalten von Tumorzellen geht immer mit einer Auflösung und Umgestaltung von extrazellulärer Matrix, dem sogenannten *connective tissue remodelling*, einher, welches vorwiegend durch Matrixmetalloproteinasen (MMP) vermittelt wird (WOODHOUSE et al. 1997). Für einige dieser MMPs ist bereits ein Zusammenhang mit maligner Dignität oder verkürztem Überleben bei CMT beschrieben (YOKOTA et al. 2001; HIRAYAMA et al. 2002; KAWAI et al. 2006; VINOTHINI et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit sollten die bereits bekannten Verknüpfungen des Relaxinsystems, bestehend aus Relaxin und seinen Rezeptoren, mit der MMP-Expression (UNEMORI und AMENTO 1990; PALEJWALA et al. 2001; BINDER et al. 2002; MASTERSON et al. 2004; HENNEMAN et al. 2008) auf ihre prognostische Eignung bei CMT überprüft werden.

Einleitung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte, deren Ergebnisse jeweils in einem Fachartikel publiziert wurden (LAMP et al. 2009; LAMP et al. 2011). Im ersten Abschnitt der Arbeit (LAMP et al. 2009) sollte zum Einen die prognostische Verwertbarkeit der Konzentrationen von Relaxin, Östradiol und Progesteron im peripheren Blut geprüft werden. Zum Anderen sollte an einer kleineren Stichprobe die grundlegende Frage untersucht werden, ob CMT selbst Relaxin und seinen Hauptrezeptor RXFP1 exprimieren und, ob etwaige Zusammenhänge zwischen systemischen Relaxin-Blutspiegeln, der intratumoralen Expression des Relaxinsystems sowie ausgewählten MMP bestehen. Im zweiten Abschnitt (LAMP et al. 2011) sollte in erster Linie mit verbesserter Methodik die prognostische Eignung lokal im CMT exprimierter Faktoren des Relaxinsystems, des Bindegewebsumbaus und der Steroidhormonrezeptoren überprüft werden. Um die Untersuchungen des ersten Abschnitts zu ergänzen, sollten im zweiten Abschnitt auch die lokale Expression des Relaxinsystems immunhistologisch abgesichert und die prognostische Verwertbarkeit der Plasmahormone an einer größeren Stichprobe getestet werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Mammatumoren

2.1.1 Definition

Mammatumoren sind benigne oder maligne neoplastische Veränderungen der Milchdrüse, die aus epithelialen oder mesenchymalen Drüsengeweben entstehen können. Maligne Tumoren der epithelialen Drüsenanteile werden als Karzinome, maligne Tumoren der mesenchymalen Anteile als Sarkome bezeichnet (MISDORP et al. 1999). Die maligne Transformation beider Anteile wird als Karzinosarkom angesprochen. Benigne Tumoren werden allgemein in Adenome, Fibroadenome, benigne Mischtumoren und Milchgang-Papillome unterteilt (MISDORP et al. 1999).

2.1.2 Epidemiologie

Grundsätzlich können Tumoren des Gesäuges bei allen Säugetieren auftreten, die Inzidenz scheint aber bei Hund und Katze höher zu sein als bei anderen Haustieren (MISDORP et al. 1999). Canine Mammatumoren (CMT) zählen zu den häufigsten Tumoren der Hündin (SCHNEIDER et al. 1969; RUTTEMAN 2005). Die meisten Studien geben einen Anteil der malignen Tumoren an allen CMT von 46% bis 68% an (FIDLER und BRODEY 1967; DORN et al. 1968; MACVEAN et al. 1978; PRIESTER 1979; BRODEY et al. 1983; ALLEN und MAHAFFEY 1989; HELLMEN et al. 1993; SIMON et al. 1996). Zudem sind Mammatumoren vorwiegend eine Erkrankung der Hündin, doch es können auch in zirka 1% der CMT-Fälle Rüden betroffen sein (SIMON et al. 1996). Hauptsächlich erkranken ältere Hündinnen an Mammatumoren. In vorhergehenden Untersuchungen lag die höchste Tumorzinzidenz in der Altersgruppe von zehn bis zwölf Jahren (TAYLOR et al. 1976; SIMON et al. 1996). Die Existenz von Rassedispositionen für CMT ist bislang nicht abschließend geklärt. Zwar werden für einige Rassen wie Toy- und Miniaturpudel, English Springer Spaniel, Brittany Spaniel, Cocker Spaniel, Pulis, Englische Setter, Pointer, Deutsche Schäferhunde, Malteser, Yorkshireterrier und Dackel (EGENVALL et al. 2005) besonders hohe Inzidenzen genannt. Es ist hierbei jedoch zu bedenken dass für derartige Studien keine Gesamtanzahlen der im Untersuchungsgebiet gehaltenen Hunde und deren Rassen vorlagen, so dass regional häufig gehaltene Rassen bei gleicher CMT-Inzidenz öfter in Studien erscheinen als seltene Rassen.

2.1.3 Ursachen

Für die Entstehung von Mammatumoren werden für den Hund verschiedene Risikofaktoren diskutiert. An erster Stelle stehen dabei die Sexualsteroidhormone - Östrogene und Progesteron - (RUTTEMAN 1990), weil zum Einen eine deutliche Verminderung des CMT-Risikos durch eine frühe Kastration (SCHNEIDER et al. 1969; TAYLOR et al. 1976), zum Anderen eine Risikoerhöhung durch die Gabe von progesteronartig wirkenden Pharmaka allein oder durch Kombination von Progesteron und Östrogenen beschrieben wurde (JABARA 1962a; JABARA 1962b; OWEN und BRIGGS 1976; GILES et al. 1978; KWAPIEN et al. 1980; RUTTEMAN 1990; STOVING et al. 1997). Allerdings wird angenommen, dass die Steroidhormone nur bei der Entstehung der CMT von Bedeutung sind, da eine späte Kastration bei bereits existenten Tumor keinen therapeutischen Effekt hat (BRODEY et al. 1983; ALLEN und MAHAFFEY 1989; MORRIS et al. 1998) und auch maligne Tumoren und Metastasen wenige bis keine Steroidrezeptoren aufweisen (RUTTEMAN et al. 1988; DONNAY et al. 1995; GIZINSKI et al. 2004). Verschiedene andere Faktoren wie Anzahl der Trächtigkeiten, Alter bei erster Trächtigkeit, Zyklusstörungen, Pseudograviditäten und einige Wachstumsfaktoren sowie das Wachstumshormon (GH) werden in ihrem Einfluss auf das CMT-Risiko kontrovers beurteilt (PEREZ et al. 2000). Relativ gesichert erscheint mittlerweile der Einfluss einer Adipositas in den ersten Lebensjahren, die ein erhöhtes Tumorrisiko nach sich zieht (PEREZ et al. 2000).

2.1.4 Diagnostik

Klinisch lässt sich lediglich eine Verdachtsdiagnose „Mammatumor“ stellen, denn dysplastische und hyperplastische Veränderungen oder Entzündungen des Gesäuges sowie der umgebenden Gewebe können ebenfalls Umfangsvermehrungen verursachen. Mammatumoren lassen sich ab einer Größe von 3 cm ertasten (BRODEY et al. 1985) und präsentieren sich dann zumeist als derbe subkutane Zubildungen, die je nach Invasivität und Dignität verschieblich oder mit Haut, Faszie oder Muskulatur verwachsen sind (BRODEY et al. 1985). Die äußere Haut über dem Mammatumor ist zumeist intakt und unverändert, es kann jedoch auch zur Ulzeration der über dem Tumor liegenden Haut kommen (SIMON et al. 2001). Sowohl Ulzerationen als auch der Verlust der Verschiebbarkeit zur Haut oder Faszie sind ein Zeichen von Invasivität und aggressivem Wachstum (SIMON et al. 2001). Im Fall des prognostisch ungünstigen inflammatorischen Mammakarzinoms ist der gesamte betroffene Mammakomplex deutlich entzündlich verändert (CLEMENTE et al.

2010). Die genaue Diagnose des Tumortyps als einem der wichtigsten prognostischen Parameter lässt sich nur durch die histologische oder zytologische Untersuchung eines Biopates (MISDORP et al. 1999) oder Feinnadelaspirates stellen (CASSALI et al. 2007; SIMON et al. 2009).

Informationen zu Invasivität und Metastasierungsneigung des Tumors liefern neben der histologischen Beurteilung der Tumorrandgebiete auch die Lymphknotenpalpation und die Untersuchung des Hundes mit bildgebenden Verfahren (Röntgen, Computertomographie, Sonographie). Die Lymphknotenpalpation hat dabei lediglich orientierenden Charakter, da eine Lymphknotenvergrößerung nicht spezifisch für das Vorliegen einer Metastase ist, und auch ein Lymphknoten von normaler Größe eine Mikrometastase beinhalten kann. Sichere Diagnosen zum Vorliegen von Nahmetastasen sind auch hier nur durch die pathohistologische Untersuchung zu erreichen.

Der Nachweis von Fernmetastasen kann sich besonders im Frühstadium ungleich schwieriger gestalten, da die im Allgemeinen praktizierte Röntgenuntersuchung der Lunge in Abhängigkeit von der Lokalisation erst Rundherde ab einem Durchmesser von 3 bis 6 mm darstellen kann (SUTER et al. 1974; TASSANI-PRELL 2005). Eine größere Sensitivität ist mit der weniger verbreiteten Computertomographie erreichbar (TASSANI-PRELL 2005). Die Sonographie eignet sich vorwiegend zur Darstellung seltener Metastasen in der Bauchhöhle (TASSANI-PRELL 2005). Sie wird aber auch für die nicht-invasive Beurteilung der Dignität eines Mammatumors empfohlen (MARQUARDT et al. 2005).

Während die Beurteilung des Primärtumors in den letzten Jahren durch Einführung und Weiterentwicklung der WHO-Klassifikationen (HAMPE und MISDORP 1974; MISDORP et al. 1999) zunehmend verbessert und standardisiert wurde, ist die Beurteilung des metastatischen Potentials oft mit Schwierigkeiten verbunden: In der histologischen Untersuchung des Primärtumors kann lediglich die Invasivität des Tumors, nicht aber die Fähigkeit der Zellen am Zielort auch biologisch aktiv zu werden und sich zu teilen, beurteilt werden. Auch das Vorliegen oder Fehlen von Lymphknotenmetastasen ist nicht immer ein sicheres Kriterium, da einige Tumoren häufiger hämatogen als lymphogen metastasieren (HELLMEN et al. 1993) und so den Lymphknoten umgehen. Desweiteren können die bildgebenden Verfahren lediglich das Vorliegen von Metastasen ab einer bestimmten Größe anzeigen. Sichere Indikatoren, die das metastatische Potential vor dem Eintritt der Metastasierung abschätzen, fehlen dagegen. Daher soll ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung potentieller Gewebemarker zur Früherkennung von Metastasierung liegen.

2.1.5 Biologisches Verhalten und Prognose

Das biologische Verhalten eines CMT richtet sich in erster Linie nach der histologisch beurteilbaren Dignität: Maligne CMT zeigen zumeist ein schnelles und oft infiltratives Wachstum. Sie neigen in 10% bis 50% der Fälle zur Metastasierung vorwiegend in regionale Lymphknoten und in die Lunge, aber auch in Leber, Niere und Gehirn und haben eine hohe Rezidivneigung (BOSTOCK 1975; CLEMENTE et al. 2010). Unter den verschiedenen Tumortypen ist die Prognose von einfachen Karzinomen besonders schlecht, weil diese häufig invasiv wachsen und zum Zeitpunkt der chirurgischen Resektion zumeist bereits Mikrometastasen vorliegen (MISDORP und HART 1979). Benigne CMT hingegen wachsen langsamer, meist expansiv und sind meist von einer Kapsel umschlossen (MISDORP et al. 1999). Aktuelle Untersuchungen an Mammatumoren von Menschen und Hunden legen nahe, dass benigne Tumoren die Vorbedingung für das Auftreten von malignen Tumoren sind. Es handelt sich hierbei nicht um zwei unterschiedliche Entstehungen, sondern um einen kontinuierlichen Transformationsprozess von gesundem Mammagewebe hin zum malignen Tumor (SORENMO et al. 2009).

Zu den wichtigsten prognostischen Kriterien, mit deren Hilfe die Lebenserwartung des Patienten geschätzt werden soll, gehören neben dem histologischen Tumortyp gemäß WHO-Klassifikation (MISDORP et al. 1999; SIMON et al. 2001), das Stadium gemäß TNM-Klassifikation (OWEN 1980; BOSTOCK 1986; PHILIBERT et al. 2003; JAIN und RAGHUNATH 2008), der histologische Grad (GILBERTSON et al. 1983; KURZMAN und GILBERTSON 1986; SIMON et al. 2001; KARAYANNOPOULOU et al. 2005) sowie das Alter der Hündin (HELLMEN et al. 1993). Dabei führt insbesondere das Auftreten von Metastasen in der Lunge zu erheblichen Einschränkungen vitaler Funktionen und kann damit die Überlebensdauer entscheidend beeinflussen. Demzufolge ist für invasiv wachsende maligne CMT beschrieben, dass 65% bis 86% der Hunde in den ersten zwei Jahren nach der chirurgischen Tumorentfernung zumeist infolge des Tumors verstarben (BOSTOCK 1975; BOSTOCK 1986).

In den letzten Jahren gab es zunehmend Bestrebungen auch molekulare Marker für eine verbesserte Prognostik heranzuziehen (KLOPFLEISCH et al. 2011; RIVERA und VON EULER 2011).

So zeigen metastatische CMT gegenüber nicht-metastatischen CMT ein in vieler Hinsicht abweichendes Profil exprimierter Gene (KLOPFLEISCH et al. 2010). Die Nutzung dieser Gene zur Vorhersage von Metastasierung gestaltet sich dennoch weiterhin schwierig. Einige der untersuchten Gene eignen sich zwar für die Überlebenszeitprognose (KLOPFLEISCH et al. 2011),

für die molekulare Erkennung von metastatischen CMT scheint bislang aber nur die Kombination von verschiedenen Markergenen verwendbar (KLOPFLEISCH et al. 2010). Studien, die den Vorhersagewert der neuen Markergenkombination für die Metastasenerkennung mittels Uni- oder Multivarianzanalyse ermitteln, fehlen bislang. Dies ist neben der schwierigen Standardisierung immunhistologischer Methoden ein Grund dafür, dass diese und auch andere neue molekulare Prognostika für die Überlebenszeit noch kein fester Bestandteil der Routinediagnostik geworden sind (KLOPFLEISCH et al. 2011).

2.1.6 Therapie

Die rechtzeitige chirurgische Entfernung des CMT mittels Mastektomie stellt unverändert die am weitesten verbreitete Therapiemethode dar (NOVOSAD 2003). Bestrahlungen werden bisher nur vereinzelt angewandt und eignen sich vor allem, um inoperable Tumoren palliativ zu behandeln oder unvollständig resezierte Tumoren lokal zu kontrollieren (NOVOSAD 2003). In jüngerer Zeit gab es neue Bestrebungen Mammatumoren medikamentös zu behandeln, allerdings war die Therapie mit dem beim Menschen eingesetzten Tamoxifen beim Hund wenig erfolgreich und sehr nebenwirkungsreich (SIMON et al. 2001). Auch versuchsweise bei Hündinnen eingesetzte in der Humanmedizin verwendete Chemotherapeutika brachten keinen Überlebensgewinn (SIMON et al. 2006). Eine bessere Wirksamkeit der klassischen Chemotherapie könnte in Zukunft durch den Nachweis von Chemotherapieresistenz-vermittelnden Transportproteinen in Tumorproben von CMT-Patienten und anschließende Individualisierung des Therapieprotokolls erzielt werden (HONSCHA et al. 2009).

Ein neuer Ansatz, der bei humanen Prostatatumoren (FENG et al. 2007) und Brustkrebszellen (HOSSAIN et al. 2010) vielversprechende erste Resultate erbrachte, ist die Modulation der Relaxinrezeptorwirkung durch neue Antagonisten zur Unterbindung der Metastasierung, auf die im Abschnitt 2.2.2.5.3 näher eingegangen werden soll. Die Grundvoraussetzung für eine derartige Behandlung der Hündin ist die Existenz eines Relaxinrezeptors in CMT, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte.

2.2 Ausgewählte Einflussfaktoren bei CMT-Erkrankungen

Auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten endokrinen und enzymatischen Faktoren einer CMT-Erkrankung soll im Folgenden näher eingegangen werden.

2.2.1 Sexualsteroidhormone

Bei weiblichen Tieren ist neben den Östrogenen wie dem 1 β -Östradiol auch das Progesteron ein wichtiges Sexualsteroidhormon. Auf die Funktionen und Eigenschaften der weiblichen Sexualsteroidhormone soll im Folgenden näher eingegangen werden, da ihnen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von CMT zuzukommen scheint (SCHNEIDER et al. 1969).

2.2.1.1 Östrogene

Die Synthese der Östrogene, namentlich Östron, Östradiol und Östriol, erfolgt vorwiegend in den Granulosazellen der Ovarfollikel durch Aromatisierung von Androgenvorstufen (DE CARVALHO PAPA 2001). Östrogene sind essentiell für die Entwicklung der funktionsfähigen adulten Milchdrüse, da sie die Verzweigung und Differenzierung der Gangepithelien fördern (GJOREVSKI und NELSON 2011). Dieser proliferationsfördernde Effekt kann auch bei der Entstehung von Mammatumoren bedeutsam sein, da frühe Kastrationen von Hündinnen innerhalb der ersten Lebensjahre eine erhebliche Minderung des CMT-Risikos zur Folge haben (SCHNEIDER et al. 1969; TAYLOR et al. 1976), während späte Kastrationen nach mehreren Läufigkeiten oder nach Feststellung von CMT keinen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben (BRODEY et al. 1983; BOSTOCK 1986; MORRIS et al. 1998). Dies wird allgemein als Indiz dafür gewertet, dass Östrogene für die weitere Progression einer CMT-Erkrankung keine Bedeutung haben.

Auch wenn die therapeutische Beeinflussung von Östrogenrezeptoren (ER) beim Hund mit CMT-Erkrankung wenig erfolgversprechend scheint (SIMON et al. 2006), so ist dennoch ein möglicher prognostisch verwertbarer Zusammenhang zwischen der Expression von ER α bzw. ER β und dem klinischen Verlauf von Interesse. Bisherige immunhistochemische Untersuchungen zu Östrogenrezeptoren in CMT ergaben ein geteiltes Bild sowohl hinsichtlich der Rezeptordichte in CMT-Geweben als auch zu deren prognostischer Verwertbarkeit:

Die Arbeit von MANEE-IN et al. (2009) konnte keinen Unterschied in der Rezeptordichte zwischen CMT-Gewebe und gesundem Mammagewebe feststellen, während mehrere andere Arbeiten diesbezüglich signifikante Unterschiede zwischen malignen CMT und benignen CMT bzw.

gesundem Mammagewebe fanden (RUTTEMAN et al. 1988; NIETO et al. 2000; MARTIN DE LAS MULAS et al. 2004; MARTIN DE LAS MULAS et al. 2005; MILLANTA et al. 2005). Einzelne Autoren sehen Östrogenrezeptoren ähnlich wie in der Humanmedizin als prognostisch wertvoll an (NIETO et al. 2000), während andere keine prognostische Verwertbarkeit feststellen konnten (MARTIN DE LAS MULAS et al. 2005; MILLANTA et al. 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zu dieser Diskussion ein weiterer Beitrag durch die Anwendung moderner molekularbiologischer Methoden geleistet werden.

2.2.1.2 Progesteron

Progesteron ist bei der Hündin in erster Linie ein Hormon des Gelbkörpers, sowohl im nicht-graviden Zyklus als auch in der Trächtigkeit (SOKOLOWS 1971; CONCANNON et al. 1989). Für die Entwicklung der Milchdrüse der Hündin ist Progesteron das dominierende Steroidhormon, da es die Ausbildung der wichtigen Drüsenstrukturen fördert (GJOREVSKI und NELSON 2011). Auch für die Entstehung von CMT ist Progesteron als das entscheidende Hormon zu sehen wie im Abschnitt 2.1.3 dargelegt wurde. Auch wenn Progesteron für den weiteren Verlauf einer bestehenden CMT-Erkrankung nicht relevant zu sein scheint, so ist von verschiedenen Autoren die Dichte des Progesteronrezeptors auf eine mögliche prognostische Nutzung hin untersucht worden. Es konnte zwar immunhistologisch eine verminderte Rezeptordichte in malignen CMT im Vergleich zu Benigen und gesundem Mammagewebe festgestellt werden (RUTTEMAN et al. 1988; MILLANTA et al. 2005), jedoch ist der prognostische Nutzen dieser Information umstritten. MARTÍN DE LAS MULAS et al. (2005) sowie MILLANTA et al. (2005) konnten keinen prognostischen Wert der PR-Dichte dokumentieren, während die Arbeit von CHANG et al. (2009) einen positiven Zusammenhang zwischen PR-Dichte und Überlebenszeit beschreibt.

Bislang wird die Untersuchung auf PR in CMT-Proben nicht in der Routinediagnostik durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Expression von mRNA des PR untersucht werden, um einen möglichen prognostischen Wert dieses bislang noch nicht im CMT mittels qPCR analysierten Parameters zu überprüfen.

2.2.2 Relaxin

2.2.2.1 Die Relaxin-Peptidfamilie

Relaxin ist ein Peptidhormon der Insulin-Superfamilie, dessen Erstbeschreibung bereits zum Beginn des 20. Jahrhunderts anhand seiner geweberweichenden Effekte auf die Beckensymphyse von Meerschweinchen und Kaninchen erfolgte (HISAW 1926). Mittlerweile ist bekannt, dass es neben dem sogenannten Relaxin mehrere Mitglieder einer ganzen Relaxin-Peptidfamilie gibt. Diese besteht beim Menschen aus H1-Relaxin (HUDSON et al. 1983), H2-Relaxin (HUDSON et al. 1984), dem eigentlichen Relaxin, sowie H3-Relaxin (BATHGATE et al. 2002), und den *Insulin-like peptides* (INSL) INSL3 (ADHAM et al. 1993), INSL4 (CHASSIN et al. 1995), INSL5 (CONKLIN et al. 1999) und INSL6 (LOK et al. 2000). Bei vielen Tierspezies einschließlich des Hundes ist bislang nur ein RLN1-Gen, das dem menschlichen H2-Gen entspricht, nachgewiesen worden (BRYANT-GREENWOOD und SCHWABE 1994; WILKINSON et al. 2005). Sein Produkt soll im Folgenden als Relaxin bezeichnet werden (Abb. 2.1).

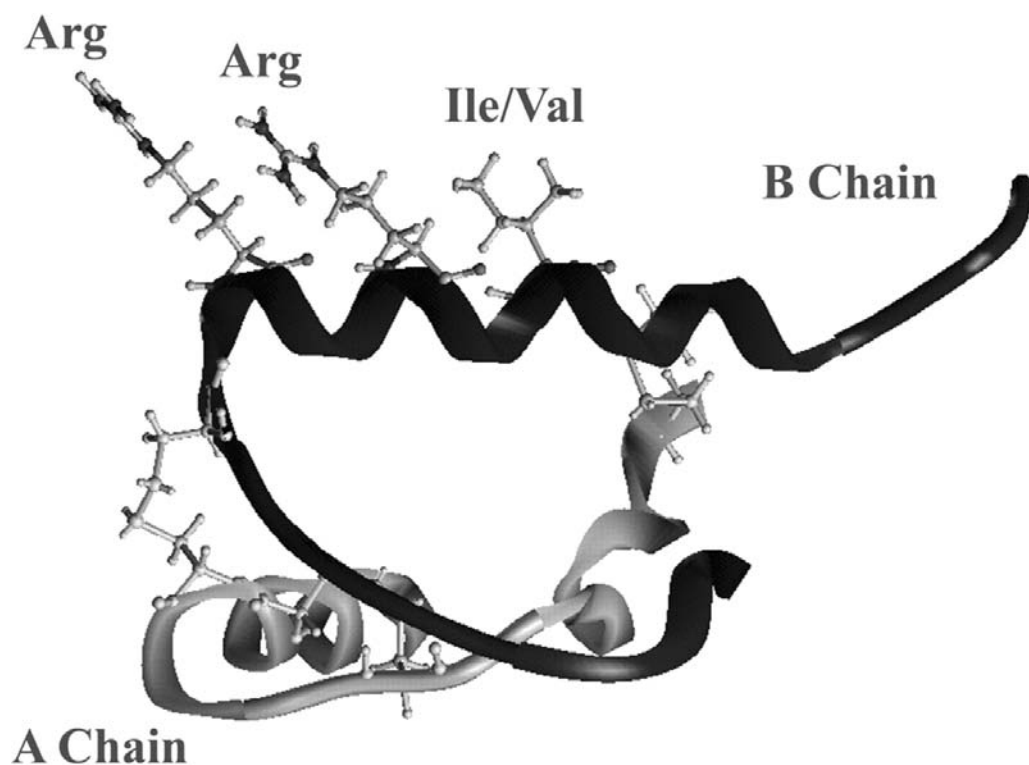


Abbildung 2.1:

Darstellung der dreidimensionalen Struktur des Relaxins, bestehend aus der A-Kette (A Chain, grau) und B-Kette (b Chain, schwarz). Besonders hervorgehoben sind die Aminosäuren Arginin (Arg), Isoleucin (Ile) und Valin (Val) (BATHGATE et al. 2006).

2.2.2.2 Aufbau und Syntheseorte

Wie alle Mitglieder der Relaxin-Peptidfamilie hat Relaxin eine dem Insulin ähnliche Struktur:

Das reife, 6.000 Da schwere Relaxin besteht nach dem Ablauf einer mehrschrittigen Synthese mit verschiedenen posttranslationalen Modifikationen von einem Präpro- über ein Propeptid zum reifen Peptid aus einer A- und einer B-Kette, die durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind (BATHGATE et al. 2006) (Abb. 2.1).

Das Relaxin des Hundes hat nur eine geringe Sequenzhomologie mit den Relaxinmolekülen anderer Spezies von 40%-60% in der A-Kette und 40%-50% in der B-Kette (STEWART et al. 1992), wobei diese geringe Homologie eine häufige Beobachtung beim Speziesvergleich der Moleküle der Relaxin-Peptidfamilie ist (WILKINSON et al. 2005).

Die Hauptquelle für das Relaxin der Hündin ist die Plazenta (STEINETZ et al. 1990; TSUTSUI und STEWART 1991; KLONISCH et al. 1999; EINSPANIER et al. 2002). Weitere Orte der Relaxinsynthese von untergeordneter Bedeutung sind die Ovarien (STEINETZ et al. 1990; MARTIN et al. 2009) und möglicherweise die Milchdrüse (GOLDSMITH et al. 1994; LAMP et al. 2009). Relaxin ist damit ein wichtiges Trächtigkeitshormon der Hündin. Während im nicht-graviden Zyklus nur niedrige Blutspiegel bis 1 ng/ml (EINSPANIER et al. 2002) erreicht werden, steigt in der Gravidität die Relaxinkonzentration im Blut auf bis zu 33 ng/ml.

2.2.2.3 Physiologische Wirkungen

Die Lokalisationen der Relaxinbildung weisen bereits darauf hin, dass Relaxin eine wichtige Rolle im Reproduktionsgeschehen zukommt. Allerdings handelt es sich bei Relaxin um ein außerordentlich pleiotropes Hormon, dessen jeweilige Effekte sowohl stark von dem angesprochenen Gewebe als auch von der jeweiligen Spezies abhängen. Im Folgenden soll daher auf verschiedene Relaxin-Effekte, die im Zusammenhang mit Mammatumorerkrankungen von Bedeutung sein können, eingegangen werden.

2.2.2.3.1 Relaxin im Reproduktionsgeschehen

Aus Untersuchungen an Menschen und nicht-menschlichen Primaten ist bekannt, dass Relaxin an für die Implantation des Fetus wichtigen Umbauvorgängen am Endometrium beteiligt ist (HISAW 1964; UNEMORI et al. 1999; EINSPANIER et al. 2001; GOLDSMITH et al. 2004). Auch bei der Hündin ist plazentares Relaxin ein wichtiges Graviditätshormon (STEINETZ et al. 1989; STEWART et al.

1992). In den zahlreichen Arbeiten von STEINETZ et al. (1987, 1989, 1990, 1996) konnten erhöhte Relaxinkonzentrationen nur bei tragenden Hündinnen ab der dritten bis vierten Graviditätswoche festgestellt werden, wohingegen Relaxin im Plasma von nicht tragenden Hündinnen kaum oder nicht nachweisbar war. Diese Ergebnisse konnten von anderen Untersuchern bestätigt werden (EINSPANIER et al. 2002). Gleiches wurde bei pseudograviden, hysterektomierten oder ovariectomierten nicht tragenden Hündinnen beschrieben (STEINETZ et al. 1987; STEINETZ et al. 1989; STEINETZ et al. 1990; STEINETZ et al. 1996; EINSPANIER et al. 2002). Die Kenntnis der physiologischen Relaxinkonzentrationen ist die Grundlage für die Beurteilung erhöhter Relaxinspiegel im Rahmen von Studien zur pathologischen Bedeutung von Relaxin bei verschiedenen Krankheitsbildern, auf die in späteren Abschnitten eingegangen werden soll.

2.2.2.3.2 Relaxinwirkungen außerhalb des Reproduktionsgeschehens

Auch außerhalb des Reproduktionstraktes hat Relaxin verschiedene Wirkungen. Dabei ist es ein wichtiger Regulator des Bindegewebsumbaus (engl. *connective tissue remodelling*) wie sich bereits bei seiner Entdeckung mit der Erweichung der Beckensymphyse andeutete (HISAW 1926). So zeigen Mausmodelle ohne eigene Relaxinproduktion eine zunehmende Fibrosierung vieler Organe (SAMUEL et al. 2003; DU et al. 2003; SAMUEL et al. 2004b; SAMUEL und HEWITSON 2006) und entgegengesetzt können Relaxingaben die Kollagenüberproduktion in Fibrosemodellen beenden (UNEMORI et al. 1996; SAMUEL et al. 2004a; LEKGABE et al. 2005; MOOKERJEE et al. 2006). In zahlreichen anderen Studien konnte die Potenz des Relaxins als ein Induktor von bindegewebsabbauenden Enzymen wie den Matrix-Metalloproteinasen (MMP) durch Relaxin dargelegt werden. Relaxin ist damit ein Regulator des Bindegewebsumbaus. Beispielsweise konnte eine Steigerung der MMP-Expression durch Relaxin *in vitro* an Ratten-Granulosazellen (TOO et al. 1984) und humanen Hautfibroblasten (UNEMORI und AMENTO 1990) gezeigt werden. Ähnliche positive Stimuli wurden unter anderem auch für humane Fibroblasten der Lunge (UNEMORI et al. 1996), des Uterus (PALEJWALA et al. 2001), des Zahnhalteapparates (HENNEMAN et al. 2008) und der Niere (MASTERSON et al. 2004; HEEG et al. 2005) beschrieben. Die Vielzahl der betroffenen Gewebe und die Potenz des Relaxins, alleine die Fibrose in Mausmodellen aufzuheben, unterstreichen die Bedeutung des Relaxins für die Steuerung des physiologischen Bindegewebsauf- und -abbaus. Auf die pathologischen Aspekte des relaxinbedingten *connective tissue remodelling* soll im folgenden Abschnitt 2.2.2.4 eingegangen werden.

Relaxin scheint außerdem eine Bedeutung bei der Steuerung kardiovaskulärer Funktionen zuzukommen. Seit längerem ist bekannt, dass Relaxin in der Lage ist die Produktion des hochpotenten Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) zu stimulieren (BANI-SACCHI et al. 1995; BANI et al. 1998) sowie die Bildung neuer Gefäße über die Induktion des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) (UNEMORI et al. 1999; PALEJWALA et al. 2002) zu fördern und somit blutdrucksenkend zu wirken. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass Relaxin bei der chronischen Herzinsuffizienz des Menschen als herzeigenes Kardioprotektivum produziert wird (DSCHIETZIG et al. 2001). Die Bedeutung des Relaxins für Herzerkrankungen des Hundes ist bislang lediglich *in vivo* in einer auf canine Mammatumoren ausgerichteten Studie von SCHWEIZER (2010) untersucht worden. Dabei konnten keine Unterschiede in der peripheren Relaxinkonzentration bei Hündinnen mit Mammatumoren und subklinischen Herzerkrankungen gegenüber gesunden Kontrolltieren festgestellt werden. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Material handelte es sich um Proben von einem Teil der von SCHWEIZER (2010) untersuchten Hündinnen. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf den lokal im Mammatumour exprimierten Faktoren und nicht auf den von SCHWEIZER (2010) untersuchten Relaxin-Plasmaspiegeln lag, wurden etwaige Herzerkrankungen in der Analyse nicht berücksichtigt.

2.2.2.4 Pathologische Effekte des Relaxins

Neben verschiedenen Tumorerkrankungen des Endometriums (KAMAT et al. 2006) und der Schilddrüse (HOMBACH-KLONISCH et al. 2006) sowie der Prostata (THOMPSON et al. 2006; FENG et al. 2007) scheint Relaxin eine wichtige Bedeutung beim Brustkrebs der Frau zuzukommen. So konnte eine gegenüber gesundem Brustgewebe erhöhte Produktion von Relaxin in Mammatumoren auf RNA- und Protein-Ebene (TASHIMA et al. 1994) sowie erhöhte Plasmaspiegel bei Brustkrebspatientinnen gegenüber Kontrollpatienten (BINDER et al. 2004) nachgewiesen werden. Zudem zeigten in letzterer Studie Patientinnen mit Metastasen höhere Spiegel als Metastasenfreie (BINDER et al. 2004). *In vitro*-Untersuchungen von BINDER et al. (2002) ergaben, dass eine Relaxin vermittelte Invasivitätssteigerung in zwei Brustkrebszelllinien mit einer erhöhten Expression von MMP einhergeht und somit auch im humanen Mammatumour ein fördernder Einfluss des Relaxins auf den Bindegewebsumbau vorliegen kann.

Bemerkenswert ist, dass die Wirkung von Relaxin auf Mammatumormodelle von verschiedenen Faktoren wie Dosis, Dauer der Einwirkung und Art der untersuchten Zelle abzuhängen scheint.

Auf der einen Seite finden sich Arbeiten, die bei vorwiegend hohen Dosen im mikromolaren Bereich oder Langzeitapplikation geringerer Dosen proliferationshemmende und Differenzierung fördernde Effekte an Brustkrebszellen (BIGAZZI et al. 1992; BANI et al. 1994; SACCHI et al. 1994; RADESTOCK et al. 2008) oder in Mausmodellen (BANI et al. 1999; RADESTOCK et al. 2008) beobachteten. Demgegenüber stehen Arbeiten, die auch bei der Langzeitapplikation von geringen Dosen einen verstärkenden Effekt von Relaxin auf die Invasivität von humanen und caninen Tumorzellen (BINDER et al. 2002; SILVERTOWN et al. 2003) oder in Mausmodellen (HABLA 2010) dokumentieren.

Somit bleibt festzustellen, dass der genaue Mechanismus und die exakten Bedingungen, unter denen sich die verschiedenen Relaxineffekte in Mammatumoren manifestieren nicht zuletzt aufgrund der Vielzahl der verwendeten Methoden und Zelllinien noch nicht abschließend beurteilen lassen.

Zu der Bedeutung des Relaxins für den Mammatumor des Hundes gibt es bislang nur wenige Untersuchungen. Zum Einen verwendeten SILVERTOWN et al. (2003) in der zuvor erwähnten Arbeit canine Mammatumorzellen, zum Anderen bearbeitete SCHWEIZER (2010) angelehnt an die Arbeit von BINDER et al. (2004) die Frage, ob sich eine CMT-Erkrankung auf die Relaxinkonzentration im Blut von Hündinnen auswirkt. SCHWEIZER (2010) kam zu dem Ergebnis, dass anders als bei der Frau weder veränderte Relaxin-Blutspiegel gegenüber Kontrolltieren auftreten, noch diesbezüglich prognostisch verwertbare Unterschiede zwischen den Hündinnen vorliegen.

Bei verschiedenen humanen Tumoren wurde eine auto- oder parakrine Bedeutung von Peptiden der Relaxinfamilie und ihren Rezeptoren beschrieben (KLONISCH et al. 2007). Daraus folgernd ergibt sich die Frage, ob Relaxin möglicherweise lokal im CMT produziert wird und dieses die Invasivität von Tumorzellen beeinflussen kann, ohne dass es im Blut nachweisbar ist. Dieser Fragestellung und einer möglichen prognostischen Verwendbarkeit der lokal exprimierten Faktoren sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden.

2.2.2.5 Relaxinrezeptoren

Die Wirkungen des Relaxin werden zumeist über spezielle Rezeptoren aus der LGR-Subfamilie, den sogenannten LGR (engl. *Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors*) (HSU et al. 2000; HSU et al. 2002; KUMAGAI et al. 2002) vermittelt. Sie werden in der Nomenklatur der International Union of Pharmacology (IUPHAR) (SUMMERS et al. 2009) als RXFP1 (engl. *Relaxin*

Family Peptide Receptor 1) und RXFP2 bezeichnet, sind aber auch unter den lange verwendeten Bezeichnungen LGR-7 und LGR-8 bekannt. Die Relaxinwirkung wird hauptsächlich durch RXFP1 vermittelt (HSU et al. 2002), dennoch besitzt auch RXFP2, dessen eigentlicher Ligand das Insulin-ähnliche Peptid 3 (INSL3) ist (KUMAGAI et al. 2002), ebenfalls eine, wenn auch niedrigere Affinität zu dem Relaxinmolekül (SCOTT et al. 2005).

Somit können sowohl RXFP1 als auch RXFP2 wichtige Schaltstellen für die Umsetzung von Relaxin vermittelten Signalen sein. Sie sind daher Untersuchungsschwerpunkte in der vorliegenden Arbeit, so dass ihr einzigartiger Aufbau, ihre Lokalisation und ihre Wirkweise im Folgenden näher erläutert werden sollen.

2.2.2.5.1 Lokalisation, Struktur und Funktion von RXFP1 und RXFP2

Die beiden Rezeptoren, RXFP1 und RXFP2, stellen eine Besonderheit dar, da es sich um G-Protein gekoppelte 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren handelt, die ein für die Aktivierung essentielles extrazelluläres Segment, das sogenannte *low-density lipoprotein receptor type A* (LDLa)-Modul, aufweisen (HSU et al. 2002; SCOTT et al. 2006). Damit unterscheiden sie sich von allen anderen bekannten G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren in Säugetieren, bei denen LDLa-Module bislang nicht beschrieben wurden (HSU et al. 2002). Für die Hormone der Insulin-Superfamilie ist es zudem untypisch, dass die Wirkung durch 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren vermittelt wird, da für die übrigen Hormone dieser Gruppe lediglich Tyrosinkinase-Rezeptoren bekannt sind (BATHGATE et al. 2006).

Die Rezeptoren des Relaxins sind mit einer Endodomäne in der Zellmembran verankert und ragen mit einer Ektodomäne, an der sich das angesprochene LDLa-Modul (HSU et al. 2002) und die für diese Rezeptoren namensgebenden zehn Leucin-reichen Wiederholungen (LRR, engl. *leucine-rich repeats*) befinden, aus der Zellmembran heraus.

Die Bindung von Relaxin an beiden Rezeptoren erfolgt vorwiegend an der Ektodomäne und anschließender Konformationsänderung (BÜLLESBACH und SCHWABE 2005). Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass RXFP1 als der Hauptrezeptor des Relaxins in Form eines funktionellen Komplexes mit verschiedenen anderen Proteinen, einem sogenannten Signalosom, vorliegt (HALLS und COOPER 2010). Zu diesem Signalosom gehören neben RXFP1 unter anderem die Enzyme Adenylatzyklase 2 (AC2) und Phosphodiesterase E4D3, die die Sekundärbotenstoffe zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat (cAMP) bzw. Inositol-3-Phosphat (IP3) bilden können. Dieses Signalosom ist in der Lage bereits auf extrem geringe, sub-pikomolare

Relaxinkonzentrationen mit einer Steigerung der cAMP-Konzentration zu reagieren (HALLS und COOPER 2010), die über mehr als sechs Stunden anhalten kann (CALLANDER et al. 2009). Die Aktivierung der Adenylatzyklase zur Steigerung der cAMP-Konzentration ist im Allgemeinen der Hauptsignalweg beider Relaxinrezeptoren (HALLS et al. 2007) und wird sowohl über stimulatorische G_s-Proteine direkt als auch im Fall von RXFP1 über eine Aktivierung der IP3-Proteinkinase-C-Kaskade indirekt ausgelöst (NGUYEN und DESSAUER 2005). Neben dieser lange bekannten Fähigkeit der Relaxinrezeptoren eine Steigerung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (CHEN et al. 1988; FEI et al. 1990) zu vermitteln, sind RXFP1 und RXFP2 in der Lage, in verschiedenen Zellen und Geweben je nach dem für diesen Wirkort vorgesehenen Relaxineffekt unterschiedliche und teilweise zellspezifische Signalwege zu aktivieren. Diese sind unter anderem der Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)-Signalweg (ZHANG et al. 2002) sowie eine Stimulation der NO-Produktion (BANI-SACCHI et al. 1995) im Zusammenhang mit Blutfluss- und Blutdruckregulation.

Der pleiotropen Funktion des Relaxins entsprechend finden sich Relaxinrezeptoren in den unterschiedlichsten Lokalisationen. Für den Menschen ist das Protein von RXFP1 in Uterus, Zervix und Brustgewebe (KOHSAKA et al. 1998) nachgewiesen worden. Nachweise von RXFP-mRNA liegen auch für weitere Organe vor (HSU et al. 2002). Die RXFP1-Expression ist für den Hund bisher nur in einer Studie untersucht worden (MARTIN et al. 2009), zumal auch die Protein- und mRNA-Sequenzen des RXFP1 für den Hund bisher lediglich als Vorhersagen aus einem computerbasierten Genomsequenzabgleich in der Datenbank des NCBI vorliegen (NCBI 2011).

Da RXFP2 der Hauptrezeptor für INSL3 ist, dessen Bedeutung vor allem für die Entwicklung und die Funktion der männlichen Keimdrüsen bekannt ist, finden sich auch die hauptsächlichen Nachweise von RXFP2 im männlichen Reproduktionstrakt (KAWAMURA et al. 2004; ANAND-IVELL et al. 2006). Allerdings wird RXFP2-mRNA auch im humanen Uterus und vielen Organen außerhalb des Reproduktionstraktes exprimiert (HSU et al. 2002). Der Nachweis der RXFP2-Expression in der Milchdrüse der Hündin konnte bislang noch nicht erbracht werden.

2.2.2.5.2 Regulation der RXFP-Signalintensität und -dauer

Da in der vorliegenden Arbeit auch die Expressionsintensität von RXFP1 und RXFP2 mittels quantitativer Real-time PCR ermittelt wurde, so dass die möglichen Verbindungen zwischen den Expressionsintensitäten von RXFP1 und RXFP2 und verschiedenen anderen Faktoren diskutiert

werden sollen, muss im Folgenden kurz auf die Besonderheiten der Regulation von Signalweiterleitung und Signalverstärkung an beiden RXFP eingegangen werden.

Die Regulation der Signalintensität und -dauer von RXFP1 und RXFP2 weist einige Besonderheiten gegenüber anderen Peptidhormonrezeptoren auf: Die Aktivierung beider Rezeptoren hält über viele Minuten bis Stunden an. Eine für G-Protein gekoppelte Rezeptoren typische deaktivierende Internalisierung dieser Rezeptoren findet nur in einem sehr geringen Umfang von bis zu 30% binnen 60 Minuten statt (CALLANDER et al. 2009; KERN und BRYANT-GREENWOOD 2009). Daher sind andere, die Signalintensität regulierende Faktoren, die entweder die Anzahl der membranständigen Rezeptoren oder die Ligandenbindung beeinflussen, von besonderer Wichtigkeit.

Die beiden entscheidenden Prozesse sind daher zum Einen die Expressionsregulation der Rezeptoren, zum Anderen die Bildung von Rezeptor-Oligomeren.

Vor allem kommt der Intensität der Rezeptorexpression eine entscheidende Bedeutung für die Stärke der Signalkaskadenaktivierung zu, da die Rezeptordichte von RXFP1 mit zirka 250 Rezeptoren pro Zelle in humanen THP-1-Leukämiezellen oder zirka 2000 Rezeptoren pro Zelle in Atriumfibroblasten neonataler Ratten (CALLANDER et al. 2009) auffallend niedrig ist.

Die Regulation der Expression der Relaxinrezeptorgene erfolgt sowohl durch fördernde Faktoren als auch durch hemmende Faktoren. Induktoren der RXFP1-Expression können das Relaxin selbst ebenso wie Medroxyprogesteronazetat sein (MAZELLA et al. 2004; LOWNDES et al. 2006). Ein weiterer wichtiger Induktor des RXFP1-Rezeptors scheinen Östrogene zu sein. Östrogene können die RXFP1-Expression in verschiedenen Geweben beeinflussen (MERCADO-SIMMEN et al. 1982; YAN et al. 2008). In einer Arbeit von (BANI et al. 1986) wurde eine Östrogenstimulation sogar als Vorbedingung für eine deutliche Relaxinwirkung an murinem Mammagewebe beschrieben und eine Aufregulation der Relaxinrezeptorexpression vermutet. Es bestehen somit nach bisherigen Erkenntnissen intensive Wechselbeziehungen zwischen Östrogenen und Relaxin durch die Beeinflussung der Relaxinrezeptor-Expression durch Östrogene einerseits, und die in Abschnitt 2.2.2.6 beschriebene Stimulation des Östrogenrezeptors durch Relaxin andererseits.

Demgegenüber stehen Beobachtungen zur Wirkung von β -TGF (MAZELLA et al. 2004) und wiederum Relaxin in der Studie von YAN et al. (2008), die an einem Gewebe eine Senkung der Expression von RXFP1 beobachteten. Somit bleibt festzuhalten, dass verschiedene Faktoren die Expressionsintensität von RXFP1 verändern können. Ein weiterer Regulator der RXFP-Aktivität neben der Expressionssteuerung könnte die Bildung von Rezeptor-Oligomeren sein. Bisherige

Theorien gehen davon aus, dass RXFP1 und RXFP2 als Monomere aktiviert werden können, doch es gibt auch einige Studien, die das Auftreten von Homo- (KERN et al. 2007; SVENDSEN et al. 2008a; SVENDSEN et al. 2008b) und Heterodimeren beider Rezeptoren (SVENDSEN et al. 2008a) *in vitro* beschreiben. Ein bei anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren beschriebener Einfluss der Oligomerisation von mehreren RXFP1- oder RXFP2-Molekülen auf Ligandenbindung, Selektivität und Rezeptorinternalisierung (MILLIGAN 2006; DALRYMPLE et al. 2008) ist bislang noch nicht beschrieben worden.

Bei allen endokrinen Einflussfaktoren ist aber immer auch zu bedenken, dass endokrine Regelmechanismen spezies- und gewebespezifisch sein können und sich auf andere Tierarten wie den Hund, für den Erkenntnisse zur Regulation von RXFP1 und RXFP2 fehlen, nur unter Vorbehalt übertragen lassen.

2.2.2.5.3 Klinische Anwendung der Relaxinrezeptoren

Bislang liegen lediglich einige Studien über eine mögliche praktische Nutzung von RXFP1 und RXFP2 bei Tumorerkrankungen vor. Zum Einen konnten FENG et al. (2009) zeigen, dass eine Blockade der RXFP1-Expression mittels *short interfering RNA* (siRNA) oder RXFP1-Defizienz in transgenen Mäusen die Invasivität von Prostatakarzinomen erheblich reduziert und Apoptose fördert. Zum Anderen erreichten HOSSAIN et al. (2010) durch den Zusatz eines antagonistisch wirkenden Relaxin-Analogons eine signifikante Verminderung der Relaxin-induzierten Invasivität von Brustkrebszellen *in vitro*. Beide Untersuchungen geben begründete Hoffnungen auf einen therapeutisch nutzbaren Effekt von Relaxin-Rezeptorantagonisten in der Krebsbehandlung.

2.2.2.6 Alternative Relaxinbindungsstellen

Die meisten Wirkungen des Relaxins werden durch die Stimulation der Relaxinrezeptoren ausgelöst. Allerdings wurden in den letzten Jahren auch mehrere andere Bindungsstellen für Relaxin entdeckt. So ist dieses Peptidhormon überraschenderweise auch in der Lage an verschiedene Steroidhormonrezeptoren (Östrogen-, Androgen- und Glucocorticoidrezeptoren) zu binden und diese zu aktivieren (PILLAI et al. 1999; DSCHIETZIG et al. 2004; VINALL et al. 2006; MOLITORIS und KOOS 2008; YAN et al. 2008; DSCHIETZIG et al. 2009; YAO et al. 2010).

Die Vielzahl der durch Relaxin aktivierbaren Bindungsstellen hilft das hier in Ansätzen dargestellte breite Spektrum der Relaxineffekte zu erklären, das von Östrogen-typischen Ödematisierungen

und Gewebsdifferenzierungen im Rahmen von Gravidität und Geburt über Glucocorticoid-typische Immuntoleranz bzw. -suppression bis hin zu Bindegewebsumbau, Blutflussregulation und Neovaskularisation in verschiedensten Geweben reicht. Relaxin wird daher zurecht als ein außerordentlich pleiotropes Hormon bezeichnet (BANI 1997).

2.2.3 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind wichtige Enzyme des Bindegewebsumbaus sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Situationen und werden von vielen verschiedenen Zellen synthetisiert und sezerniert (CHAKRABORTI et al. 2003). Sie sind die Haupteffektoren für den Relaxin-vermittelten Bindegewebsumbau, so dass sie einen weiteren Untersuchungsschwerpunkt der vorliegenden Arbeit darstellen. MMP gehören zur Familie der Zink-Endopeptidasen, die gekennzeichnet sind durch ein hoch konserviertes Motiv in der katalytischen Domäne, in dem drei Histidinmoleküle ein Zinkion binden (CLARK et al. 2008). Derzeit sind 23 Vertreter der MMP-Familie beim Menschen bekannt (CLARK et al. 2008), wobei diese grob in die klassischen sekretorischen MMP und die membrangebundenen sogenannten Membrantyp (MT)-MMP zu unterteilen sind. MMP sind je nach Typ in der Lage unterschiedliche Kollagenarten, sowie weitere Moleküle der amorphen Grundsubstanz und extrazellulären Matrix (ECM) (CHAKRABORTI et al. 2003). Neben dem Abbau von ECM, der die Migration von Zellen ermöglicht, kann die enzymatische Spaltung durch MMP auch die ECM so verändern, dass es zu verändertem Verhalten der auf ihr haftenden Zellen, zur Freisetzung von gebundenen Signalmolekülen sowie zu Abbau oder Aktivierung von anderen Effektorproteinen kommt (VU und WERB 2000).

2.2.3.1 Regulation der Synthese und Aktivität der MMP

Die meisten MMP werden als inaktive Zymogene synthetisiert, die erst durch enzymatische Spaltung aktiviert werden (MALEMUD 2006). Somit kommt neben der Transkriptions- und Translationskontrolle auch der Kontrolle der enzymatischen Aktivatoren und Inhibitoren der Enzymaktivität eine hohe Bedeutung zu, um die Aktivität dieser multipotenten Enzyme exakt zu justieren.

Zum Einen werden MMP im Rahmen von bestimmten Programmen in der Entwicklung von Geweben und Organen exprimiert, weil sie wichtige Elemente des physiologischen

Bindegewebsumbaus sind (CLARK et al. 2008). Zum Anderen kann Ihre Aktivität auch stimulationsbedingt verändert werden, da sie auch beispielsweise in den Mechanismen der Wundreparatur essentiell sind (CLARK et al. 2008). Bekannte Regulatoren der Genexpression von MMP sind unter anderem das Relaxin (TOO et al. 1984; UNEMORI und AMENTO 1990) sowie Interleukine, Interferone, verschiedene Wachstumsfaktoren wie der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) und der extrazelluläre Matrix-Metalloproteinase-Induktor (EMMPRIN) (STERNLICHT und WERB 2001). Die Reaktion auf den gleichen externen Mediator kann je nach Spezies und Organ allerdings sehr variieren (SAMUEL 2005). Relaxin ist beim Menschen ein besonders potenter Induktor von MMP-1 (UNEMORI und AMENTO 1990; UNEMORI et al. 1996; PALEJWALA et al. 2001), wohingegen es bei Nagern besonders deutlich MMP-13 induziert (BENNETT et al. 2003; MASTERSON et al. 2004).

Die Aktivierung der MMP-Zymogene kann sowohl durch bereits aktive MMP oder Serinproteasen extrazellulär (CHAKRABORTI et al. 2003) oder in einigen Ausnahmefällen bereits in der Zelle proteolytisch erfolgen (STERNLICHT und WERB 2001).

Von entscheidender Bedeutung sind die Hemmung der aktiven MMP und ihre endgültige Inaktivierung, da ein unkontrollierter Abbau von Bindegewebe zum Verlust des Zell-ECM-Kontaktes und unerwünschten Gewebszerstörungen führen kann. Hierbei kommt den *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (TIMP) eine wichtige Funktion zu. Diese sind eine Familie von vier Molekülen, die in der Lage sind reversibel und nicht-kovalent an MMP zu binden und deren Aktivität zu unterbinden (CHAKRABORTI et al. 2003). Die verschiedenen TIMP haben dabei unterschiedliche Affinitäten zu bestimmten MMP und weisen auch eine unterschiedliche Genregulation und gewebsspezifische Expressionsmuster auf (STERNLICHT und WERB 2001). Ähnlich wie MMP reagiert auch die TIMP-Expression auf die Bindung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Relaxin (UNEMORI und AMENTO 1990).

Während die von der Zelle relativ genau in Menge und Lokalisation steuerbare Sekretion von TIMP hilft, die Aktivität von MMP im perizellulären Raum auf kleine Areale zu fokussieren, wird in den Gewebsflüssigkeiten die Aktivität der MMP durch das ubiquitäre α 2-Makroglobulin unterbunden (STERNLICHT und WERB 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivität der MMP sowohl durch die Steuerung der Expression, der eine direkte Freisetzung des inaktiven Zymogens folgt, sowie durch die Steuerung von MMP-Aktivierung und -Hemmung erfolgt. Bei der Expressionssteuerung und der MMP-Hemmung kann Relaxin von Bedeutung sein.

2.2.3.2 MMP in caninen Mammatumoren

Veränderte Gewebskonzentrationen von MMP-mRNA und -Protein sind in sehr vielen Krankheitsbildern beschrieben, so dass hier nur auf die Rolle der MMP in Mammatumoren des Hundes eingegangen werden soll.

Die bisherigen Untersuchungen zum Auftreten von MMP in Mammatumoren des Hundes behandeln vorwiegend MMP-2 und MMP-9 sowie Membrantyp 1 (MT1)-MMP als Aktivator von MMP-2, aber auch die Expression von MMP-3 mRNA konnte gezeigt werden (SORENSEN et al. 2005). Diese immunhistologischen, zymographischen oder elektrophoretischen Analysen weisen darauf hin, dass MMP-2 und MMP-9 in malignen CMT stärker exprimiert werden, bzw. eine höhere Aktivität haben als in Benigen (YOKOTA et al. 2001; HIRAYAMA et al. 2002; KAWAI et al. 2006; VINOTHINI et al. 2009). Die hauptsächliche Expression liegt bei benignen und dysplastischen Mammagewebe im Myoepithel und sonstigen Basalmembranbereichen, während in malignen CMT vorwiegend epitheliale Tumorzellen und angrenzende Fibroblasten immunopositiv für MMP-2 sind (PAPPARELLA et al. 1997; HIRAYAMA et al. 2002; PAPPARELLA et al. 2002). Analog zeigt sich auch für MMP-9, dass die Intensität der Proteinexpression, bzw. die Aktivität mit einer Steigerung der Malignität zunimmt (YOKOTA et al. 2001; HIRAYAMA et al. 2002; KAWAI et al. 2006; VINOTHINI et al. 2009). Allerdings scheint es bei MMP-9 im Gegensatz zu MMP-2 keine Änderung der exprimierenden Zelltypen von benignen zu malignen Neoplasien zu geben, da in beiden Dignitäten die MMP-9-Expression in epithelialen Tumorzellen dominiert (HIRAYAMA et al. 2002). Eine prognostische Eignung der MMP-Expression oder -Aktivität in CMT-Patientinnen konnte bislang lediglich für im Blutserum messbares MMP-9 nachgewiesen werden (YOKOTA et al. 2001).

3 Ergebnisse

3.1 Publikation 1

Ole Lamp, Kerstin U. Honscha, Jacqueline Jakob, Julika Lamp, Stephan Schweizer, Anne Reischauer, Jutta Gottschalk, Anke Hahn, Matthias Ebert, Sven Rothmund, Silvia Blaschzik und Almuth Einspanier

Investigation of the local expression of the relaxin system in canine mammary tumours

Reproduction in Domestic Animals 2009; 44 (Suppl. 2): 224-229.

Investigation of the Local Expression of the Relaxin System in Canine Mammary Tumours

O Lamp¹, KU Honscha², J Jakob¹, J Lamp¹, S Schweizer³, A Reischauer⁴, J Gottschalk¹, A Hahn¹, M Ebert¹, S Rothmund⁵, S Blaschzik³ and A Einspanier¹

¹Institute of Physiological Chemistry; ²Institute of Physiology; ³Department of Small Animal Medicine; ⁴Institute of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine; ⁵IZKF, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Contents

While mammary tumours are the main reasons of death in bitches, early detection of tumours and metastases is crucial for survival of affected dogs. Invasiveness and angiogenesis, which are important processes of tumour growth and spreading, require connective tissue remodelling. This process is dominantly mediated by matrix metalloproteinases (MMP), which are well known to be positively regulated by relaxin (RLX) in various tissues, including human breast cancer. So far, the presence of RLX and its receptor RXFP-1 as well as their linkage with MMP in canine mammary tumours (CMT) is completely unknown. In the first part of the present study, concentrations of RLX, oestradiol and progesterone from plasma samples of bitches with CMT were compared with clinical and survival data to investigate the predictive value of these hormones. In the second part, the expressions of RLX, RXFP-1 and MMP-2, -9 and -13 were examined by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in 31 CMT samples. Finally, relationships of systemic plasma RLX or locally expressed RLX with expression of MMP in CMT were analyzed for the first time. Comparison of hormone concentrations in 93 bitches in terms of benign or malignant nature of the CMT, lung metastases, recidivation and 12-month survival discovered no significances. The expressions of RLX, RXFP-1 and MMP were independent from plasma RLX, but expressions of local RLX and RXFP-1 showed a strong correlation ($p = 0.00004$, $r = 0.671$) as well as RXFP-1 and MMP-2 ($p = 0.009$, $r = 0.463$), indicating a possible significant role of the locally produced RLX in CMT pathogenesis as an inducer of connective tissue remodelling.

Introduction

Tumours are the main reason of death in dogs (Simon et al. 2001), in particular, canine mammary tumours (CMT) are the most important neoplasms in the bitch (Rutteman 2005). Early detection of mammary tumours and metastasis is of relevance as there is no regular screening of high-risk canine patients established as in women, while the occurrence of metastases is critical for the survival of dogs after mastectomy. Invasiveness and neovascularization, which are the main processes in tumour progression, need a cleavage of extracellular fibre to allow migration of cells. This process is known as connective tissue remodelling and is mediated by different factors. One of the most important is the enzymes of the family of matrix metalloproteinases (MMP). Their role in CMT has been described in several studies, where their activity was found to be higher in malignant CMT than in benign or normal mammary tissue (Yokota et al. 2001; Hirayama et al. 2002; Kawai et al. 2006). These potent mediators of connective tissue

remodelling are known to be regulated by the peptide hormone relaxin (RLX), which is related to both physiological (Palejwala et al. 2001; Henneman et al. 2008) and pathological situations like human breast cancer (Binder et al. 2002). Recent studies have established RLX as a marker for human breast cancer and poor prognosis (Binder et al. 2004). The situation of the RLX system and its linkage to MMP is still unknown in mammary tumours of the dog.

In our first study, we examined plasma RLX in relation to clinical and histopathological parameters (Schweizer et al. 2007). Relaxin did not show any significant correlation to the parameters examined. Yet, there were tendencies towards higher plasma RLX in bitches bearing malignancies than in those with benign CMT, which could be explained by the variable histology of the canine tumours and the high variation of peripheral RLX content. Therefore, one aim of the current study was to analyze and correlate peripheral plasma concentrations of RLX, progesterone and oestradiol-17 β by using the same database as Schweizer et al. (2007) and to examine RLX concentrations in a survival time analysis in order to investigate the predictive value of these parameters. The other aim of this study was to investigate the local expression of factors involved in tissue remodelling, such as the RLX system (RLX and its receptor RXFP-1/LGR-7) and MMP. This included proof of RLX production in mammary tissue of the dog, which is still lacking compared with women (Mazoujian and Bryant-Greenwood 1990; Tashima et al. 1994).

Materials and Methods

Animals

Canine mammary tumours from patients undergoing surgical treatment have been collected at the Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig, since 2003. This tumour bank also contains clinical information, including 12–24 months of follow-up data, plasma specimens from defined stages and tumour specimens from over 90 bitches with mammary tumours. Bitches with stage 4 of Owen's tumour, necrosis, Metastases (TNM) classification or those that had already been treated surgically were excluded from the study. The main breeds were crossbreed (22%), German Shepherd (18%), Yorkshire Terrier (13%) and Dachshund (11%). The mean age at the first mammary gland surgery was 9.7 years (range 5.5–15 years). Histopathological diagnoses were

reviewed according to WHO nomenclature (Misdorp et al. 1999). Excised tumours were characterized as malignant (92.5%, $n = 86$), suspected malignancies (3.2%, $n = 3$) or benign (4.3%, $n = 4$). For hormone analysis, all collected samples ($n = 93$) were used and split into two groups according to the concentration of plasma RLX. Bitches in group A ($n = 17$) had RLX concentrations above 1.0 ng/ml of plasma, whereas bitches in group B ($n = 76$) had plasma RLX concentrations of 1.0 ng/ml or below. For the molecular biological examination, mammary tumour tissue samples ($n = 31$) were selected from the tissue bank from bitches with extra-ordinary high (group 1, $n = 15$) or low (group 2, $n = 16$) plasma RLX concentrations, in order to examine if the peripheral RLX concentration on the day of tumour surgery is linked with on the local expression of the RLX system and related MMP. Relaxin concentrations of group 1 ranged 2.70–38.05 ng/ml of plasma, whereas for group 2 were between 0.05 and 0.19 ng/ml of plasma.

Assays

All blood samples were heparin stabilized. They were centrifuged at $4300 \times g$ and plasma was stored at -20°C for further analysis immediately after collection. Concentrations of RLX, oestradiol-17 β and progesterone were measured by ELISA as previously published (Einspanier and Hodges 1994; Gottschalk 1999; Einspanier et al. 2002; Kaskous et al. 2003).

Tumour tissue

Tumour specimens were collected from the excised mammary tissue and divided into two parts. One part was stored in paraformaldehyde for 24 h followed by paraffin embedding for histology, while the other half was frozen in liquid nitrogen after adding RNeasy[®] RNA stabilizing reagent (Applied Biosystems, Ambion, Austin, TX, USA) and stored for molecular biology at -80°C . For gene expression studies, frozen tissue samples were manually homogenized in liquid nitrogen and total RNA extraction was performed using TRIzol[®] LS Reagent (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany), according to the manufacturer's instructions, but with a modified volume of 1.0-ml TRIzol instead of 0.75 ml per 50–100 mg of tissue. Total RNA extraction was followed by polyA⁺ mRNA isolation with an Oligotex[®]-mRNA-Mini-Kit (QIAGEN GmbH, Hilden,

Germany) as described in the standard instructions. First-strand cDNA synthesis was carried out once under identical conditions for all samples using Superscript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogen GmbH) with oligo(dT)-primers, according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time RT-PCR

Primers for canine glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), RLX, RXFP-1 and MMP-2, -9 and -13 and the corresponding amplicon sizes are given in Table 1. All primer sets were intron spanning to avoid unnoticed amplification of genomic DNA. The specificity of each pair of primers was evaluated by RT-PCR and agarose gel electrophoresis combined with the sequencing of the PCR product, which was checked against the corresponding NCBI database entries as given in Table 1. Real-time PCR was run on a RotorGene[®] 6000 (Corbett Research Australia, Mortlake, NSW, Australia) with Sensimix dT[®] (Quantace Ltd, Berlin, Germany) using SYBR[®] Green I (Quantace Ltd). Every run had the same touchdown temperature profile [hold: 95°C , 10 min; cycle 1 (repeated 16 times): 95°C , 15 s; 58°C , 30 s, decreasing 1 K every repeat; 72°C , 20 s; cycle 2 (repeated 30 times) 95°C , 15 s; 55°C , 30 s; 72°C , 20 s] and ended with a melt curve analysis of all tubes. The cycle threshold (Ct) values received for every parameter were normalized for the GAPDH Ct value of each specimen. The reciprocal value of this ratio was used as a relative indicator for expression intensity.

Statistical methods

The SPSS software (SPSS GmbH Software, Munich, Germany) was used for all statistical investigations. Differences of hormone concentrations between groups were analyzed with a Mann–Whitney *U*-test and correlations between hormone plasma concentrations were carried out by calculating Spearman's rho. Statistical comparison of gene expressions between groups was made using a two-tailed Student's *t*-test and an analysis of expression's correlations was executed by computing Pearson's correlation coefficient. Survival curves were produced according to the Kaplan–Meier method and were compared using a log-rank test. In all statistical calculations, $p \leq 0.05$ was accepted as indicating significance.

Table 1. Primer sequences, product sizes and according NCBI-ID of the mRNA

Target gene/NCBI-ID	Primer	Oligonucleotide sequence (5'–3')	Product size (bp)
GAPDH/AB038240.1	Sense	CGG GGC CAA GAG GGT CAT CAT	550
	Antisense	CGG CGT CGA AGG TGG AAG AGT	
RLX/NM_001003132.1	Sense	CGG ATG ACA AGA AAC TTA AGG C	427
	Antisense	CAA CCT ACA TTA CAA CAT TTA TCA C	
RXFP-1/XM_532702.2	Sense	GCT GTG CCT GCA AAA CAA TA	182
	Antisense	GGG AAA TTC GAC TGA GGT GA	
MMP-2/XM_535300.2	Sense	CTG ATG GCA CCC ATT TAC ACC	449
	Antisense	TCC ACC CGC TGA ACG TCA G	
MMP-9/NM_001003219.1	Sense	GAA CTA ATC TCA CTG ACA AGC AG	327
	Antisense	ACA CGC GAG TGA AGG TGA G	
MMP-13/AF201729	Sense	GCC AAA TTA TGG AGG AGA TGC C	334
	Antisense	AAA GAT CAT TGT TTC TCC TCG GAG	

Results

Analysis of hormone levels

Analysis of hormones from 93 bitches yielded medians of plasma concentration on the day of the first surgery: 0.33 ng/ml for RLX (ranging 0.05–40.06 ng/ml), 2.02 ng/ml for progesterone (ranging 0.11–20.61 ng/ml) and 1129.38 pg/ml for oestradiol (ranging 56.00–3310.00 pg/ml). There were no correlations between any of these three observed hormones. Comparison of plasma concentrations of RLX, progesterone and oestradiol between bitches classified according to the CMT's benign or malignant nature, radiologically detectable lung metastases, recidivation and 12-month survival discovered no significances. However, comparing the hormone concentrations of bitches in relation to their TNM stage, only the oestradiol concentrations from stage 1 (median 1175.40 pg/ml) were significantly higher ($p = 0.037$) than in stage 3 dogs (median 1095.00 pg/ml). Physiological plasma RLX concentrations in the cycle were reported as 1.0 ng/ml and below (Einspanier et al. 2002). There were some bitches (group A, $n = 17$) with concentrations of plasma RLX above this threshold. Therefore, these high-RLX bitches were tested against bitches with RLX concentrations claimed to be in the physiological range (group B, $n = 76$) by a Kaplan–Meier survival analysis. Death as a result of CMT was followed up over an analysis period of 24 months. The survival curve showed a non-significant trend towards lower survival of bitches from group A (see Fig. 1). Dogs from group A, if they had died because of mammary tumour ($n = 4$), also had a decreasing survival time over an increasing plasma RLX concentration in a scatter-dot plot (plot not shown). Because of the small number of cases, a correlation analysis was impossible.

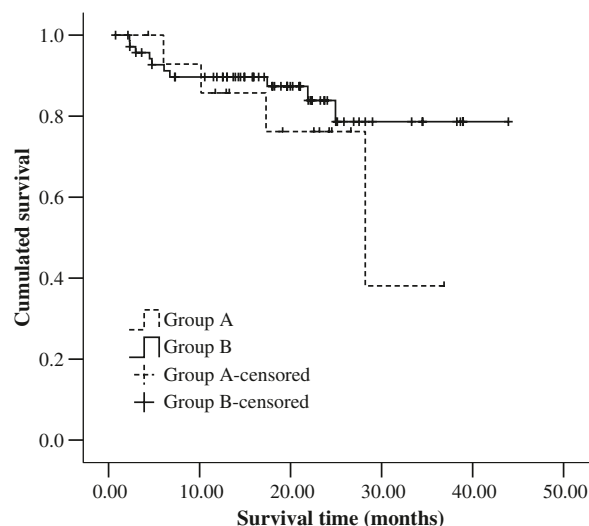


Fig. 1. Kaplan–Meier plot of the survival time of bitches with RLX levels above 1.0 ng/ml of plasma (group A, $n = 17$) and of bitches with RLX levels at 1.0 ng/ml and below (group B, $n = 76$) on the day of mastectomy. Only survival times until death because of CMT were used for analysis, all other survival time data were censored

Expression analysis

Real-time RT-PCR analysis of tumour samples showed distinct expression of RLX, RXFP-1 and MMP-2, -9 and -13 in all specimens. In group 1 (high plasma RLX, $n = 15$), the normalized relative expressions (mean values \pm SD) were: RLX 0.59 ± 0.05 , RXFP-1 0.46 ± 0.04 , MMP-2 0.92 ± 0.07 , MMP-9 0.61 ± 0.07 , MMP-13 0.63 ± 0.06 . Analysis of group 2 (low plasma RLX, $n = 16$) gave the following results (shown as mean values \pm SD): RLX 0.60 ± 0.03 , RXFP-1 0.47 ± 0.03 , MMP-2 0.95 ± 0.07 , MMP-9 0.61 ± 0.04 , MMP-13 0.62 ± 0.06 . The statistical comparison of expression between both groups revealed no significant differences in any factor. Therefore, further evaluation was carried out on all specimens ($n = 31$). The subsequent analysis showed a strong linear correlation between the local expressions of RLX and RXFP-1 ($p = 0.00004$, $r = 0.671$; see Fig. 2a) and also a linear correlation between RXFP-1 and MMP-2 expressions ($p = 0.009$, $r = 0.463$; see Fig. 2b).

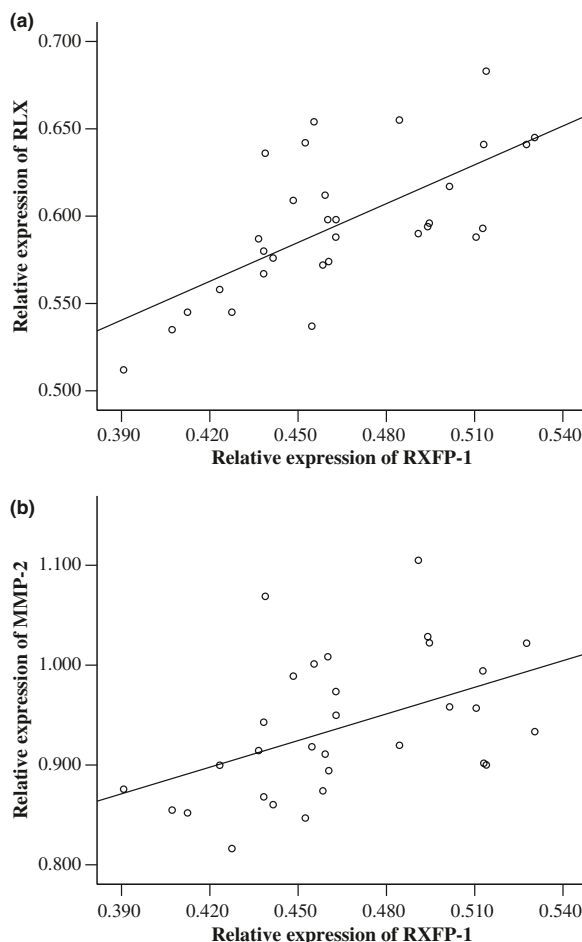


Fig. 2. Correlation of expression of RXFP-1 with local RLX expression (a) and correlation of RXFP-1 with expression of MMP-2 in canine mammary tumours (b), $n = 31$

Discussion

One aim of this study was to examine whether RLX is a marker for diagnosis or prognosis of CMT, as it has been described for humans (Binder et al. 2004). The hormone analysis of 93 bitches with CMT as presented here reflected wide variation of RLX plasma concentrations in this study. Seventeen animals (18%) showed high RLX concentrations (ranging 1.14–40.06 ng/ml RLX), which could not be explained with the physiological oestrous cycle, where levels up to 1.0 ng/ml RLX have been described (Einspanier et al. 2002). It is well known that the physiological sources of RLX are the ovaries and placenta of the bitch (Steinetz et al. 1989; Tsutsui and Stewart 1991; Klonisch et al. 1999). Higher RLX concentrations have only been described for pregnant bitches (Steinetz et al. 1987; Einspanier et al. 2002) or for pathological conditions, such as human cardiovascular insufficiency (Dschietzig et al. 2001) and degenerative ligament diseases in humans (Dragoo et al. 2003) as well as hip dysplasia in dogs (Steinetz et al. 2008). All analyzed CMT bitches were not pregnant during this study and did not have health problems in terms of cardiovascular system or degenerative ligament diseases. While the mammary tissue of the guinea pig (Peaker et al. 1989) or healthy and tumorous breast tissue in women (Tashima et al. 1994) have been shown to be sources of RLX, it seems likely that mammary tumours in bitches also secrete RLX. This has been postulated for the healthy canine mammary gland before (Goldsmith et al. 1994; Silvertown et al. 2003), but has not been proved yet. In contrast to Schweizer et al. (2007), who could not find a difference between dogs which had died of CMT within 12 months and those which survived the first year after mastectomy, our Kaplan–Meier survival analysis of the same data, but in a different classification (groups A vs group B), proposes a shorter survival time for CMT dogs with increased plasma RLX (group A), see Fig. 1. A separate examination of bitches from group A, which had died because of CMT, suggested a negative connection of survival time with concentrations of plasma RLX. These results would support the original hypothesis of RLX being a negative prognostic marker for mammary tumours as it is in women, but the number of cases is too low at present to confirm this observation. Our work could reveal indications towards an influence of plasma RLX on CMT disease, which needs further investigation, if plasma RLX is to become a marker for prognosis of mammary tumours in the bitch. The difficulty is the breed-specificity of RLX concentration (Steinetz et al. 1987), of which is little known, and the diversity of histological CMT types found in single dogs, which is not present in human breast cancer.

Further analysis of hormones revealed no correlation between the concentration of the steroids (oestradiol-17 β and progesterone) and RLX on the day of the mastectomy. So far, the regulatory control of RLX through steroids and other factors is still uncertain in all species. Only a regulatory action of oestrogens on the RLX receptor RXFP-1 has been described in rodents (Hsu et al. 2002). Another interesting finding was a higher oestradiol concentration in bitches with tumours

of TNM stage 1 than those at stage 3. Oestradiol is supposed to have a mitogenic effect on CMT (Queiroga et al. 2008) and could derive from early tumour stages (Marinelli et al. 2004) possibly acting as an autocrine growth stimulant. But, the influence of the oestrous cycle and hormonal treatment on this difference of oestradiol concentration has to be determined in further studies.

The second part of our project was focussed on the questions of whether there is an expression of RLX and RXFP-1 in CMTs and how it is correlated with the expression of MMP-2, -9 and -13. Firstly, it was demonstrated that there is a measurable mRNA expression of RLX and RXFP-1 as well as MMP-2, -9 and -13 in mammary tumours of the bitch. Secondly, we found a highly significant and strong correlation of RLX and RXFP-1 expression and also a correlation between the expressions of RXFP-1 and MMP-2 in CMT. Finally, there were no differences in terms of local expression of RLX, RXFP-1 and MMP-2, -9 and -13 comparing CMT samples from bitches with high concentrations of circulating plasma RLX with samples from bitches with low plasma RLX. The transcription of RLX and RXFP-1 has not been described in CMT before and demonstrates tumorous mammary tissue as a new source of RLX in the bitch. The parallel expression of the RLX receptor, RXFP-1, makes an auto- or paracrine stimulation of various RLX dependent pathways in CMT possible. Our results propose that the local expression of the RLX system in CMT is most likely linked to MMP-2 expression. Matrix metalloproteinases are potent mediators of connective tissue remodelling, which is a basic process for the spreading of tumour cells, as well as for neovascularization. Matrix metalloproteinases can therefore be claimed as key enzymes of tumour progression.

The finding of MMP expression is consistent with different studies, which have demonstrated an expression of MMP in malignant CMT, which has often been increased compared with normal or benign mammary tissue (Yokota et al. 2001; Hirayama et al. 2002; Papparella et al. 2002; Kawai et al. 2006). A similar RLX-induced upregulation of MMP has been described in breast cancer cells (Binder et al. 2002) and in fibroblasts of different origin (Palejwala et al. 2001; Henneman et al. 2008), always leading to a loss of extracellular fibre, which is, for example, a basic condition for invasiveness in CMT. So far, it is unknown if carcinoma cells are able to produce RLX themselves in order to stimulate MMP-2 expression autonomously because the RLX system in CMT has not been described yet. Preliminary results of our own immunohistochemical investigation on RLX in CMT propose carcinoma cells as producers of RLX. Because the sources of MMP-2 and -9 are carcinoma cells and fibroblasts (Papparella et al. 1997, 2002; Hirayama et al. 2002) as well as myoepithelial cells (Hirayama et al. 2002), carcinoma cells could stimulate MMP-2 production in all surrounding cells of the CMT and induce remodelling of connective tissue for their own spreading or neovascularization. Our investigations could not elucidate which form of RLX is finally secreted in

CMT. A secretion of bioactive proRLX by CMT is also possible as has been shown for breast cancer and CMT cell cultures (Silvertown et al. 2003). The secretion of both, proRLX and RLX, as well as a separate post-transcriptional regulation of RLX production, are potential explanations for the plasma RLX independence of all gene expressions we have examined.

As a conclusion, our results indicate that the locally expressed RLX plays a significant role in CMT pathogenesis. The RLX system seems to be a strong regulator of MMP-2 expression and can therefore influence the development of an invasive tumour, which causes a worse prognosis. Knowledge of the pathways which lead to more aggressive tumours enables new therapies to modulate the signalling and increase survival of the patient.

Acknowledgements

This paper is part of the PhD of O. Lamp, who is granted by Studienstiftung des deutschen Volkes. This project was partly funded by Gesellschaft für kynologische Forschung GKF (A. Einspanier/S. Blaschzik) and Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG (HO2512/1-1, K.U. Honscha; EI333/11-1, A. Einspanier). The authors thank Mrs M. Sohr, Mrs S. Tätzner, Mrs I. Urbansky, Mrs P. Herzog, Mrs P. Schleinitz, Mrs C. Paitz and Mrs M. Wipplinger for technical assistance.

Author contributions

In the molecular biology techniques the following people have been involved: O. Lamp (primer design, tissue preparation, real-time PCR), J. Jakob (tissue preparation, cDNA synthesis, real-time PCR), K.U. Honscha (tissue preparation) and M. Ebert (primer design). Immunoassays were examined by J. Gottschalk. S. Rothmund has labelled enzymes for the immunoassays. Histological analyses were carried out by A. Reischauer and J. Lamp. Collection of tissue material and follow-up data was done by S. Schweizer and S. Blaschzik. Statistical analysis was performed by O. Lamp. The paper was written by O. Lamp and A. Einspanier (senior author).

Conflicts of interest

The authors have declared no conflicts of interest.

References

Binder C, Hagemann T, Husen B, Schulz M, Einspanier A, 2002: Relaxin enhances *in vitro* invasiveness of breast cancer cell lines by up-regulation of matrix metalloproteases. *Mol Hum Reprod* **8**, 789–796.

Binder C, Simon A, Binder L, Hagemann T, Schulz M, Emons G, Trummer L, Einspanier A, 2004: Elevated concentrations of serum relaxin are associated with metastatic disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **87**, 157–166.

Dragoo JL, Lee RS, Benhaim P, Finerman GA, Hame SL, 2003: Relaxin receptors in the human female anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* **31**, 577–584.

Dschietzig T, Richter C, Bartsch C, Laule M, Armbruster FP, Baumann G, Stangl K, 2001: The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *FASEB J* **15**, 2187–2195.

Einspanier A, Hodges JK, 1994: LH- and chorionic gonadotrophin-stimulated progesterone release *in vitro* by intact luteal tissue of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Endocrinol* **141**, 403–409.

Einspanier A, Bunck C, Salpigidou P, Marten A, Fuhrmann K, Hoppen HO, Gunzel-Apel AR, 2002: Relaxin: ein wichtiger Graviditätsindikator bei der Hündin (relaxin: an important indicator of canine pregnancy). *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **109**, 8–12.

Goldsmith LT, Lust G, Steinetz BG, 1994: Transmission of relaxin from lactating bitches to their offspring via suckling. *Biol Reprod* **50**, 258–265.

Gottschalk J, 1999: Validierte Methode zur Bestimmung von Progesteron und 17beta-Oestradiol. Labormitteilungen an das Institut für Tierarzneimittel Berlin GmbH, Berlin.

Henneman S, Bildt MM, Degroot J, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW, 2008: Relaxin stimulates MMP-2 and alpha-smooth muscle actin expression by human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* **53**, 161–167.

Hirayama K, Yokota H, Onai R, Kobayashi T, Kumata T, Kihara K, Okamoto M, Sako T, Nakade T, Izumisawa Y, Taniyama H, 2002: Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. *J Comp Pathol* **127**, 249–256.

Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagi J, Kudo M, Sherwood OD, Hsueh AJ, 2002: Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* **295**, 671–674.

Kaskous S, Gottschalk J, Hippel T, Grun E, 2003: The behavior of growth-influencing and steroid hormones in the blood plasma during pregnancy of Awassi sheep in Syria. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **116**, 108–116.

Kawai K, Uetsuka K, Doi K, Nakayama H, 2006: The activity of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in mammary tumors of dogs and rats. *J Vet Med Sci* **68**, 105–111.

Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Froehlich C, Kauffold J, Steger K, Steinetz BG, Fischer B, 1999: Canine preprorelaxin: nucleic acid sequence and localization within the canine placenta. *Biol Reprod* **60**, 551–557.

Marinelli L, Gabai G, Wolfswinkel J, Mol JA, 2004: Mammary steroid metabolizing enzymes in relation to hyperplasia and tumorigenesis in the dog. *J Steroid Biochem Mol Biol* **92**, 167–173.

Mazoujian G, Bryant-Greenwood GD, 1990: Relaxin in breast tissue. *Lancet* **335**, 298–299.

Misdorp W, Hellmen E, Else RW, Lipscomb TP, 1999: Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat, 2nd series. VII. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC.

Owen LN, 1980: TNM Classification of Tumours in Domestic Animals, 1st edn. World Health Organization, Geneva, pp. 21–25.

Palejwala S, Stein DE, Weiss G, Monia BP, Tortoriello D, Goldsmith LT, 2001: Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway. *Endocrinology* **142**, 3405–3413.

Papparella S, Restucci B, Maiolino P, De Vico G, 1997: Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary gland. *J Comp Pathol* **117**, 277–282.

Papparella S, Restucci B, Paciello O, Maiolino P, 2002: Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. *J Comp Pathol* **126**, 271–276.

Peaker M, Taylor E, Tashima L, Redman TL, Greenwood FC, Bryant-Greenwood GD, 1989: Relaxin detected by immunocytochemistry and northern analysis in the mammary gland of the guinea pig. *Endocrinology* **125**, 693–698.

Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, Pena L, Lopes CS, Illera JC, 2008: Crosstalk between GH/IGF-I axis and

- steroid hormones (progesterone, 17beta-estradiol) in canine mammary tumours. *J Steroid Biochem Mol Biol* **110**, 76–82.
- Rutteman GR, 2005: Mammatumoren des Hundes. In: Kessler M (ed.), *Kleintieronkologie*. Enke, Stuttgart, pp. 237–248.
- Schweizer S, Lamp O, Reischauer A, Lamp J, Blaschik S, Grevel V, Einspanier A, 2007: Investigation of the plasma relaxin levels in bitches with mammary gland tumours as a potential prognostic marker. *Reprod Domest Anim* **42**(Suppl 1), 29.
- Silvertown JD, Geddes BJ, Summerlee AJ, 2003: Adenovirus-mediated expression of human prorelaxin promotes the invasive potential of canine mammary cancer cells. *Endocrinology* **144**, 3683–3691.
- Simon D, Schönrock D, Ueberschär S, Siebert J, Nolte I, 2001: Mammatumoren des Hundes: Diagnostik und Therapie. *Tierärztl Prax* **29**(K), 47–50.
- Steinetz BG, Goldsmith LT, Lust G, 1987: Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs. *Biol Reprod* **37**, 719–725.
- Steinetz BG, Goldsmith LT, Harvey HJ, Lust G, 1989: Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy. *Am J Vet Res* **50**, 68–71.
- Steinetz BG, Williams AJ, Lust G, Schwabe C, Bullesbach EE, Goldsmith LT, 2008: Transmission of relaxin and estrogens to suckling canine pups via milk and possible association with hip joint laxity. *Am J Vet Res* **69**, 59–67.
- Tashima LS, Mazoujian G, Bryant-Greenwood GD, 1994: Human relaxins in normal, benign and neoplastic breast tissue. *J Mol Endocrinol* **12**, 351–364.
- Tsutsui T, Stewart DR, 1991: Determination of the source of relaxin immunoreactivity during pregnancy in the dog. *J Vet Med Sci* **53**, 1025–1029.
- Yokota H, Kumata T, Taketaba S, Kobayashi T, Moue H, Taniyama H, Hirayama K, Kagawa Y, Itoh N, Fujita O, Nakade T, Yuasa A, 2001: High expression of 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) in canine mammary adenocarcinoma. *Biochim Biophys Acta* **1568**, 7–12.

Submitted: 30 June 2008

Author's address (for correspondence): Prof. Almuth Einspanier, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany. E-mail: einspanier@vetmed.uni-leipzig.de

3.2 Publikation 2

Ole Lamp, Kerstin U. Honscha, Stephan Schweizer, Anne Heckmann, Silvia Blaschzik und Almuth Einspannier

The metastatic potential of canine mammary tumours can be assessed by mRNA expression analysis of connective tissue modulators

Veterinary and Comparative Oncology 2011; no. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2011.00303.x

The metastatic potential of canine mammary tumours can be assessed by mRNA expression analysis of connective tissue modulators

O. Lamp¹, K. U. Honscha², S. Schweizer³, A. Heckmann⁴, S. Blaschzik³ and A. Einspanier¹

¹Institute of Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

²Institute of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

³Department of Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

⁴Institute of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Abstract

Metastases are the crucial factor for the prognosis of canine mammary tumours (CMTs). In women, the peptide hormone relaxin is linked with metastatic breast cancer. Therefore, the impact of relaxin and its receptors on matrix metalloproteinase (MMP) expression, metastatic disease and survival was analysed using qRT-PCR and immunohistochemistry of CMT samples from 59 bitches. The expression of relaxin and its receptor RXFP1 (relaxin family peptide receptor 1) was discovered on gene and protein levels. Intratumoural relaxin mRNA expression and relaxin plasma levels had no prognostic value. High mRNA levels RXFP1 were an independent marker of metastatic potential, with a more than 15-fold risk increase, and a predictor for shorter survival. Also, MMP-2 expression was associated with early death because of CMT. The mRNA expressions of relaxin, RXFP1 and MMP-2 were positively correlated indicating a common pathogenetic linkage. Thus, RXFP1 is proposed as a new early marker of metastatic potential in CMT and a possible therapeutic target.

Keywords

dog, mammary tumour, PCR, prognosis, relaxin, RXFP1

Introduction

Mammary tumours are the most important neoplasm in the female dog.^{1,2} Survival of dogs suffering from canine mammary tumour (CMT) is mainly dependent on the occurrence of metastases³ as those can impair the function of vital organs, such as the lung or brain. Therefore, it is essential to consider the occurrence of metastases to assess a patient's prognosis reliably.

In addition to the established histological classifications⁴ and clinical staging,⁵ many new candidates have been evaluated for their predictive value in terms of metastatic action and reduced survival, such as steroid receptors, markers of

cell adhesion or proliferation.^{6,7} However, the description of metastatic potential in CMT is still based on histological, clinical and radiographic examination, which can only report dissemination of tumour cells that has already taken place.

In women, the peptide hormone relaxin has been shown to be increased in patients with breast cancer, especially in those with metastatic disease.⁸ *In vitro* experiments have shown a prometastatic effect of relaxin which can increase invasiveness and cell motility in CF33.Mt CMT-cells⁹ as well as in the human breast cancer cells MCF-7, SK-BR3 and MDA-MB-231^{10,11} under certain conditions by stimulating the expression of

Correspondence address:
Prof. Dr Almuth Einspanier
Institute of Physiological
Chemistry
Faculty of Veterinary
Medicine
University of Leipzig
An den Tierkliniken 1,
Leipzig 04103, Germany
e-mail:
Einspanier@vetmed.
uni-leipzig.de

matrix metalloproteinases (MMPs).¹⁰ MMP play an important role in connective tissue remodelling, which is a prerequisite for cell motility and invasiveness in many physiological and pathological situations, such as wound healing, neovascularization and metastatic cancer.¹² In CMT, the expression and gelatinolytic activity of basement membrane cleaving MMP-2 and MMP-9 increase from healthy tissue towards benign to malignant lesions.^{13–18} In a recent article, evidence was obtained for a connection between MMP-2 expression and intratumourally expressed relaxin on the mRNA level in CMT samples.¹⁹ However, a significant role for systemic relaxin plasma levels was lacking.^{19,20} Therefore, the focus of this article is based on locally produced relaxin and its possible paracrine or autocrine effects through its receptors (relaxin family peptide receptors RXFP1 and RXFP2, formerly known as LGR-7 and LGR-8) expressed in CMT.

This study assessed the predictive value of the intratumoural expression of relaxin and its receptors, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-13 and that of estradiol receptors (ER α , ER β) and progesterone receptor (PR) for the occurrence of metastases and reduced survival in female dogs with CMT which were followed up after surgery.

Animals, materials and methods

Animals and study design

A total of 59 bitches with mammary tumours undergoing surgery between July 2003 and November 2006 at the Department of Small Animal Medicine at the University of Leipzig, Germany were included in this study. To focus on early-state tumours in this study, only dogs categorized at stages 1–3 according to a TNM-scheme⁵ were included, whereas dogs with an earlier mammary surgery and stage 4 dogs were excluded as the latter already had distant metastases. The reproductive status of all bitches was documented. Before surgery, all dogs underwent a full clinical examination including radiological examination of the lung as the main target of distant metastasis.²¹ Information on lymph node status was obtained by histopathology of the inguinal lymph node after surgical treatment. The dogs were followed up after surgery until they died or patient contact was accidentally lost. The reason

of natural death or euthanasia was explored from clinical documentation, necropsy or the owner's report. Six months after surgery, the dogs were examined again radiologically. For endocrine status examination, heparin-stabilized plasma samples were obtained from all bitches on the day of surgery and stored at -20°C immediately after centrifugation. Plasma concentrations of relaxin, estradiol-17 β and progesterone were analysed using ELISA techniques as published.^{19,22,23}

Samples of the palpable tumour nodules were excised separately immediately after mastectomy of the affected mammary complexes. Samples were divided and one half was stored instantly in RNeasy[®] (Qiagen, Hilden, Germany) and frozen at -80°C after an incubation of 24 h at $4-7^{\circ}\text{C}$. The other half was fixed in formalin (4%) for 24 h at $4-7^{\circ}\text{C}$ and embedded in paraffin for histological examination. Specimens for qRT-PCR were kept frozen until RNA extraction for 6–24 months after sampling. One to three RNA samples were obtained from all 59 dogs resulting in a total number of $n = 74$ samples.

RNeasy stabilized samples from macroscopically unaffected mammary tissue were also collected after mastectomy. Unfortunately, they turned out to be tumorous under histological examination or had too low a gland:fat ratio for successful RNA preparation. All assays were carried out at the Institute of Physiological Chemistry; histopathological examination of all tumours was performed at the Institute of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine at the University of Leipzig, Germany.

Nucleic acid extraction

First, 80–150 mg of gently squeezed sample tissue was crushed under liquid nitrogen using a mortar and pestle, then the sample was transferred into an ice-cooled glass homogenizer and then 1 mL of TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) per ≤ 100 mg of tissue was added, following the manufacturer's instructions.

Resulting total RNA was reconstituted in DEPC-treated RNase-free water, and the RNA concentration and purity were measured spectrophotometrically (Eppendorf Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany) at a wavelength

of 260 and 280 nm. Only RNA samples with a total amount of RNA above 100 µg were allowed for further processing. RNA integrity was assessed by agarose gel electrophoresis. All samples fulfilling the quality criteria were used in an mRNA extraction with an Oligotex mRNA kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. Finally the concentration of mRNA was measured spectrophotometrically (Eppendorf Biophotometer, Eppendorf).

DNase treatment and reverse transcription

For quick preparation of the samples, combined DNase treatment and reverse transcription were carried out in four consecutive, standardized setups, each including no more than 22 samples.

Every tube contained 200 ng of mRNA in a 10 µL reaction including 1 µL of RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA) and 1 µL of reaction buffer. After incubation at 37 °C for 30 min, 1 µL of RQ1 DNase stop solution was added, followed by another incubation at 65 °C for 10 min.

Subsequently, the reverse transcription step was run in a 20 µL setup with Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), 100 pmol of Oligo(dT)₁₂₋₁₈, 1 µL of 10 mM dNTP-Mix, 1 µL of 0.1 M DTT buffer and 1 µL of water in the same order and with the incubation steps as described in the manufacturer's instructions. Finally the cDNA was stored at -20 °C.

Variation of the reverse transcription reaction was documented by means of four tissue-mRNA samples, which were run in each of the four cDNA synthesis reactions. Finally, all 16 resulting cDNA samples were analysed in all qPCR experiments, and relative quantities were computed as described in the following section. The mean overall coefficient of variation (CV) ± SD for the relative quantification of all four-fold sample analyses over all was 0.51 ± 0.28.

qPCR targets

The target sequences and all other details concerning the primer sets used are given in Table 1. The sequences of the primer sets for hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), ATP-synthase subunit 5B (A5B) and ribosomal protein L32 (RP-L32) have been described

by Etschmann and colleagues²⁴ as most stable in canine mammary tissue. All other primers used in this study were created using the Primer3Plus engine.²⁵ The self-designed primers and their corresponding amplicon sequences were tested in silico using the BLAST algorithm²⁶ to evaluate specificity and the tools of RTprimerDB²⁷ to predict possible relevant secondary structures. The primers were manufactured by metabion international, Planegg-Martinsried, Germany at high performance liquid chromatography (HPLC)-grade purity. The ERα primers were designed to match both transcript variants, whereas the ERβ primer design was based on a common subsequence of all 28 transcript variants described.

qPCR protocol

qPCR reactions were executed on a Rotor Gene 6000 (Qiagen) using 50-µL tubes from the same company in a 72-well rotor using the Sensimix SYBR Kit (Bioline, Luckenwalde, Germany) including polymerase, dNTPs, buffers and SYBR Green I with a total reaction volume of 20 µL of the following composition: 2 µL of cDNA, 10 µL of 2× Sensimix, 0.4 µL of 50× SYBR Green I, primer oligonucleotides in the concentration as given in Table 1 and 20 µL of water. Optimal primer concentrations had been evaluated for all final primer sets at 50, 100, 200 and 400 ng µL⁻¹ to test for good efficiency and the absence of primer dimers in the no-template controls (NTC). The final concentration of MgCl₂ was 3.0 mM. All qPCR reactions were run with the following temperature profile: 10 min at 95 °C; 45 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 56 °C, 15 s at 72 °C and melting process with an increase from 50 to 99 °C in steps of 1 K.

Because not all samples and quality controls could be analysed in one 72-slot rotor, samples were divided into two clusters each including NTC and five interrune calibrator samples in duplicate. The PCR of the second cluster was run no later than 18 h after the first cluster. All assays were repeated 1 month later.

qPCR validation

Specificity was assessed by gel electrophoresis and the sequence analysis of selected samples as

Table 1. This table gives the primer pairs used for the analysis, including the National Center for Biotechnology Information (NCBI)-ID of the referring mRNA sequence, the position of the first primer base on the 5'-3'-mRNA, the length of the resulting amplicon in basepairs (bp) as well as the length of all spanned introns

Name	NCBI-ID	Direction	Position (bp)	Sequence	Amplicon length (bp)	Spanned intron length (bp)	Primer concentration (nmol μL^{-1})	Mean PCR efficiency \pm SD
HPRT	NM_000194.2	Forward	314	TGC TCG AGA TGT GAT GAA GG	192	0	100	1.998 \pm 0.021
		Reverse	505	TCC CCT GTT GAC TGG TCA TT				
A5B	NM_001686.3	Forward	1474	GCA CGG AAA ATA CAG CGT TT	187	953	100	2.037 \pm 0.009
		Reverse	1708	TTG CCA CAG CTT CTT CAA TG				
RP-L32	XM_854019.1	Forward	298	ATG CCC AAC ATT GGT TAT GG	181	0	100	2.047 \pm 0.010
		Reverse	478	CTC TTT CCA CGA TGG CTT TG				
Ubiquitin	XM_538142.2	Forward	235	CGT GGT GGT GCT AAG AAA AG	136	60	100	2.046 \pm 0.006
		Reverse	370	GAC GAA GGC GAC TGA TTT TG				
RLX	NM_001003132.1	Forward	183	TCG GCA GAT ATC CGA ACC	114	3880	100	2.045 \pm 0.010
		Reverse	296	ATC CTC AGT TCC TGT GGC ATA C				
RXFP1	XM_532702.2	Forward	477	GCT GTG CCT GCA AAA CAA TA	182	4795	100	1.991 \pm 0.012
		Reverse	658	GGG AAA TTC GAC TGA GGT GA				
RXFP2	NM_001005870	Forward	129	CCGTGC TTT TCA CTG TGA TG	93	2436	100	1.989 \pm 0.019
		Reverse	221	CCA AAT ATA GTC GCC CAT CC				
MMP-1	XM_546546	Forward	929	CAG GTT CTA CAT GCG CGT AA	166	1457	100	2.045 \pm 0.006
		Reverse	1049	CTG ACC CTG AAC AAC CCA GT				
MMP-2	XM_535300.2	Forward	1560	GGA TGC TGC CTT TAA TTG GA	202	3965	100	2.033 \pm 0.012
		Reverse	1761	CGC ACC CTT GAA GAA GTA GC				
MMP-3	NM_001002967	Forward	817	GGA CCT CCC TCT GAT TCT TC	216	842	100	2.046 \pm 0.016
		Reverse	1032	GGA TGG CCA AAA TGA AGA GA				
MMP-9	NM_001003219.1	Forward	335	GGC AAA TTC CAG ACC TTT GA	214	363	100	2.025 \pm 0.007
		Reverse	548	CGT GCT CCC TAA CAC CAA AC				
MMP-13	XM_536598.2	Forward	548	TTT TGG CTC ATG CTT TTC CT	194	1903	100	2.028 \pm 0.021
		Reverse	741	GCC CGT GTA GGT GTA GAT GG				
ER α	XM_533454	Forward	538	GCC AAG GAG ACT CGC TAC TG	284	77136	200	2.050 \pm 0.004
		Reverse	821	TCA TCT CTC TGG CGT TTG TG				
ER β	AY237535	Forward	118	TCT CCC TTA GCC ATC CAT TG	160	1862	50	2.022 \pm 0.014
		Reverse	277	GAC TAG TAA TGG GGC TGG CA				
PR	NM_001003074	Forward	2004	TGT CGC CTT AGA AAG TGC TG	149	35153	100	2.039 \pm 0.021
		Reverse	2152	TGG CTT AGA GCT TGG CTT TC				

The final concentration of each primer in the PCR-mix and the mean PCR efficiency and its SD over all runs are also presented. The genes analysed are hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), ATP-synthase subunit 5B (A5B), ribosomal protein L32 (RP-L32), ubiquitin, relaxin (RLX), relaxin family peptide receptor 1 (RXFP1), matrix metalloproteinases (MMP)-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, estradiol receptors (ER)- α and ER β and progesterone receptor (PR).

well as by melt curve analysis for every sample and the NTC. To check whether genomic DNA contamination could be detected for every primer set, a qPCR was run with a canine genomic template parallel to a cDNA template, followed by a melt curve analysis and agarose gel electrophoresis. All genomic amplicon melt curves showed peaks deviating by at least 2 K from the peaks observed for cDNA samples.

All NTC either gave no signals or they have been classified invalid, either by LinRegPCR²⁸ because of failed amplification or a missing plateau phase or by melt curve analysis. PCR efficiency was calculated with LinRegPCR 11.5.²⁸ The mean efficiencies for all assays are listed in Table 1. Five calibrator samples were run in duplicate in all PCR runs to compare the parallelism of quantification between the two clusters. The ratios of the mean relative quantities of every single calibrator sample from Clusters 1 and 2 were used to calculate correction factors for Cluster 2 for every single gene. The mean \pm SD of these factors was 1.03 ± 0.28 .

Data analysis

Raw qPCR data was exported from the RotorGene 6000 series software, version 1.7 (Build 87) (Qiagen) into LinReg 11.5.²⁸ The data were analysed in LinRegPCR using common Windows of Linearity and common thresholds for all samples of the same run. For the calculation of the mean efficiency the following samples were excluded using LinRegPCR: efficiency outliers outside 5% of the group median, samples without amplification or plateau phase.

The calculation of relative quantities was based on the mean efficiency of the run. A mean relative quantity for both repeated measurements was calculated for every sample. The repeated quantification of a sample had a mean CV \pm SD of 0.22 ± 0.16 . The mean relative quantities of all samples analysed in Cluster 2 were calibrated with a gene specific factor computed as described above. Four reference genes, described as suitable for canine mammary tissue^{24,29} were analysed in all samples and underwent another stability analysis using the Normfinder software tool (Molecular Diagnostic Laboratory, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark).³⁰ This found A5B and RP-L32

to be the most stable combination with an average stability value of 0.053. The Normfinder analysis required the input of several group arrangements.

All relative quantities of the genes of interest were divided by the geometric mean of the relative quantities of A5B and RP-L32 in the same sample for normalization purpose and were finally standardized by dividing all samples by the lowest normalized expression value of a specific gene. All samples with undetectable expression intensities were set at zero.

Statistics

Statistical analysis was carried out using PASW 18 software (SPSS, Munich, Germany). All data were not normally distributed; therefore nonparametric tests had to be applied. Differences between groups were examined using the exact Mann–Whitney *U* test. For correlation analysis, Spearman's rho was calculated. For the comparison of groups and survival analysis only one sample per patient was selected. If there were multiple samples from one patient, the malignant tumour, identified by histology, was always chosen as the crucial parameter for the patient's prognosis. In the case of more than one malignant tumour available the sample was selected by chance. A Kaplan–Meier analysis with a log rank test was used to compare survival data, but patients with a remaining untreated tumour were excluded from these calculations. Therefore, only 48 patients were available for survival analyses. To assess their suitability as prognostic markers for early death because of mammary cancer or metastatic potential possible candidates were tested by calculating Cox regression or logistic regression. For all statistics except correlation analysis $P \leq 0.05$ was accepted as indicating significance. Correlations were only assessed as significant, if $P \leq 0.01$.

Histological examination and immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded samples were cut into 5 μ m sections and mounted on L-lysine coated slides before being stained with haematoxylin and eosin (HE) or examined immunohistochemically. The tumour classification

of the HE staining was in accordance with the World Health Organisation (WHO) criteria for canine mammary neoplasms.⁴

For immunohistochemistry, deparaffinized sections were rinsed in phosphate buffered saline (PBS) two times, then incubated in 3% hydrogen peroxide and distilled water for 20 min at room temperature in a humid chamber. After another PBS-washing, sections were blocked with canine serum (1:100 in distilled water) for 45 min. Subsequently, the serum was removed and the slides were incubated with the primary antibody diluted in PBS at 4 °C for 14–17 h. Both polyclonal primary antibodies had been generated in the rabbit (Pineda Antibody Service, Berlin, Germany) as published by Ivell *et al.*³¹ The anticanine relaxin antibody was used at a dilution of 1:6000 and was directed against a synthetic immunization peptide with the sequence CGSIWWGRKAGQLRE. The antihuman RXFP1 antibody was generated using the synthetic immunization peptide MRKNKINHLNENTFAC which is identical with the canine RXFP1 NCBI reference sequence XP 532702.2 in the first 15 amino acids and was used at a dilution of 1:1200.

After another washing step, the sections were incubated with a biotinylated horse antirabbit/anti-mouse IgG-antibody (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) for 30 min, followed by streptavidin-conjugated peroxidase H (Vector Labs) according to the manufacturer's instructions and colour development with 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC). Finally, the sections were counterstained with haematoxylin for 20 s and rinsed with tap water for 10 min before being mounted with coverplates.

The positive controls for relaxin were canine corpus luteum³¹ and the blood vessels within the mammary tissue samples.³² For RXFP1, the canine uterus worked as a positive control.^{33,34} Negative controls were carried out by replacing the primary antibody with native IgG-antibody of the same species (Dianova, Hamburg, Germany) or pre-immunization serum from same rabbit.

Results

The main breeds among the 59 dogs were crossbreed (22%), German Shepherd (17%), Dachshund

(13%) and Yorkshire Terrier (12%). The mean age at the first mammary gland surgery was 9.8 years (range 5.5–14.7 years). Of 59 female dogs 12 had been neutered before tumour excision. Skin ulceration above the tumour was reported in four patients. There were five cases of inguinal lymph node metastases and nine cases with a thoracic radiography 6 months after surgery indicating lung metastases. The tumour samples analysed by qPCR were mainly malignant (89.2%, $n = 66$) and only eight samples (10.8%) were of a benign type.

A distinct expression of all genes of interest was observed in almost all 74 samples. However, some samples did not have a detectable level of expression of RXFP1 ($n = 2$), RXFP2 ($n = 30$), MMP-9 ($n = 1$), MMP-13 ($n = 1$) and ER β ($n = 9$). Valid standardized relative expression levels ranged from 1 to 8.5 (relaxin)/226.7 (RXFP1)/7538.3 (RXFP2)/57988.0 (MMP-1)/301.1 (MMP-2)/39174.4 (MMP-3)/13397.7 (MMP-9)/12230.0 (MMP-13)/5120.2 (ER α)/193329.1 (ER β)/1420.1 (PR).

The distributions of all relative expressions given as median {first quartile; third quartile} were for relaxin 3.0 {2.1; 4.6}, RXFP1 22.5 {14.2; 50.4}, RXFP2 5.5 {0; 41.3}, MMP-1 64.3 {37.7; 215.3}, MMP-2 29.8 {17.5; 61.8}, MMP-3 49.5 {10.4; 332.7}, MMP-9 153.9 {44.9; 931.7}, MMP-13 89.8 {37.0; 419.6}, ER α 489.5 {181.7; 1157.5}, ER β 180.0 {81.2; 398.8} and PR 191.6 {82.5; 421.3}.

Malignant tumours ($n = 66$) had a significantly higher expression of MMP-1, MMP-3 and MMP-13 than benign tumours ($n = 8$; $P = 0.005$; $P = 0.021$; $P = 0.031$) (data not shown), but there were no differences among the other expressions analysed. To compare further groups one sample was selected for every patient as described above. Patient's relative expressions were compared regarding the factors, occurrence of metastases, TNM stage and plasma hormone levels. To compare patients with tumours bearing higher metastatic abilities with those of weaker metastatic potential, all patients having at least one positive finding in an excised regional lymphnode or lung radiography 6 months after surgery, indicating metastasis-like structures, were classified as metastatic. The rest were classified as nonmetastatic. The expression levels of patients with metastases ($n = 13$) only differed significantly from those without detected

metastases ($n = 46$) concerning RXFP1, which showed a higher expression in the case of metastasis ($P = 0.026$) (Fig. 1). RXFP1 and MMP-2 expressions increased over TNM stages, with TNM stage 3 patients ($n = 18$) having a significantly higher expression of RXFP1 ($P = 0.008$) and a higher expression of MMP-2 ($P = 0.002$) than those at stage 1 ($n = 26$). All other genes analysed did not show significant differences of relative expression between metastatic and non-metastatic patients (Fig 2).

To discover plasma-hormone-associated expression differences, patients were grouped into two halves according to their plasma concentration of relaxin, estradiol or progesterone including either all dogs in this study or exclusively the neutered dogs only. The distributions of concentrations, given as the median [minimum; maximum], for the grouping of all dogs were for relaxin (low: 0.22 ng mL^{-1} [0.00; 0.33], high: 0.68 ng mL^{-1} [0.36; 38.05]), for estradiol (low: 4.8 pg mL^{-1} [1.3; 6.6], high: 9.3 pg mL^{-1} [7.1–13.5]) and for progesterone (low: 0.83 ng mL^{-1} [0.20; 2.49], high: 7.67 ng mL^{-1} [3.04; 11.76]). The concentrations of the neutered dogs distributed as follows: relaxin (low: 0.26 ng mL^{-1} [0.15; 0.33], high: 0.71 ng mL^{-1} [0.47; 4.46]), estradiol (low: 3.2 pg mL^{-1} [1.3; 3.8], high: 5.9 pg mL^{-1} [5.5; 12.7]) and progesterone (low: 0.78 ng mL^{-1} [0.28; 0.92]; high: 1.20 ng mL^{-1}

[0.98; 1.84]). Plasma hormones did not have a detectable connection with gene expression levels; dogs with high or low plasma concentrations did not differ in any relative expression. Also, there were no significant correlations between plasma hormones and gene expression levels.

However, over all 74 samples linear correlations of relative expressions were observed among several genes: relaxin appeared to be correlated with the expression of RXFP1 ($P < 0.001$, $R = 0.395$) (Fig. 3) as well as with MMP-2 ($P = 0.004$, $R = 0.333$) (Fig. 4). The expression of its main receptor RXFP1 was also correlated with MMP-2 ($P < 0.001$, $R = 0.408$) (Fig. 5). All the MMP analysed were correlated positively with each other to a significant extent except MMP-2 with MMP-3 (Table 2). ER α expression showed a strong correlation with the expression of PR ($P < 0.001$, $R = 0.688$, data not shown).

The Kaplan–Meier analysis of patients with metastases ($n = 9$) revealed a shorter survival time from surgery to death because of mammary cancer ($P < 0.001$) compared with patients without detected metastases ($n = 39$; Fig. 6) (for exclusion criteria from survival analysis see Section ‘Statistics’). Thus, metastases are proposed as the crucial factor for the further progression of the disease. Survival analysis for the influence of high or low gene expression disclosed a significantly reduced survival of those patients with a high RXFP1 expression (above the median level) in contrast to those with an expression below the median level ($P = 0.045$, data not shown). Also MMP-2 expression above the median was associated with reduced survival ($P = 0.049$, data not shown).

For experimental purpose a receiver operating characteristic (ROC)-curve analysis on all examined genes as a possible predictor for metastases ($n = 48$ patients, including $n = 9$ cases of metastases) was carried out and yielded the highest area under the curve (AUC) for RXFP1 (AUC = 0.718) with a sensitivity of 77.8% and a specificity of 79.5% at a cut-off value of 32.8 for relative RXFP1 expression (data not shown). RXFP1 even turned out to be an independent marker for metastases ($P = 0.003$, odds ratio = 15.4, 95% confidence interval {2.5; 94.2}) in a logistic regression analysis on 48 patients with one excised tumour in contrast

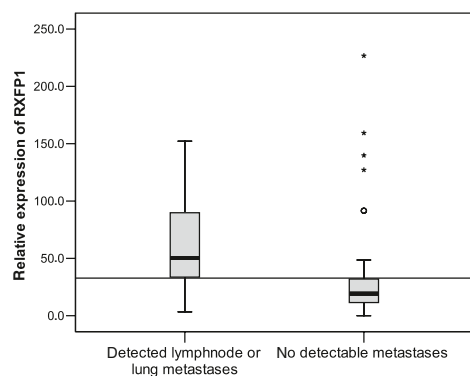


Figure 1. Levels of relative relaxin family peptide receptor 1 (RXFP1)-mRNA expression are significantly higher in tumour samples from patients with metastases ($n = 13$) than in those without metastases ($n = 46$; $P = 0.026$). The asterisks and circles mark outliers. The horizontal line indicates the cut-off at 32.8 identified by ROC-analysis.

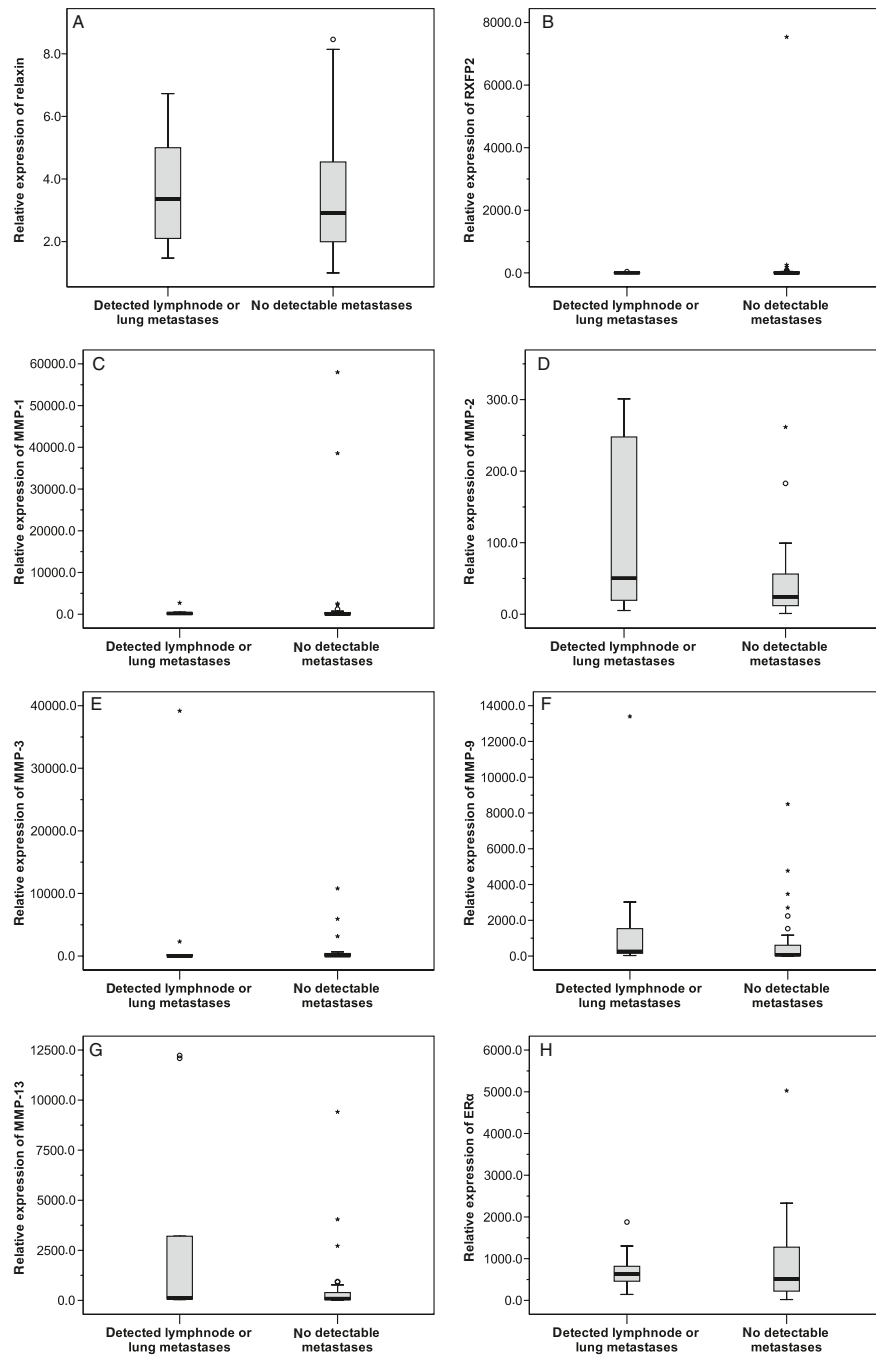


Figure 2. There were no significant differences in relative expressions in tumour samples between patients with detected lymphnode or lung metastases ($n = 9$) and those patients without detectable metastases ($n = 39$) in the following genes: (A) relaxin, (B) relaxin-family peptide receptor RXFP2, (C) matrix metalloproteinase (MMP)-1, (D) MMP-2, (E) MMP-3, (F) MMP-9, (G) MMP-13, (H) estradiol receptor (ER)- α , (I) ER β and (J) progesterone receptor (PR). The asterisks and circles mark outliers.

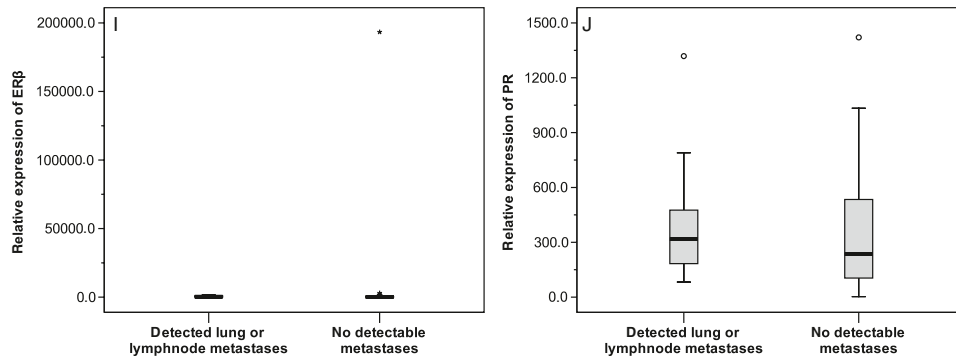


Figure 2. Continued

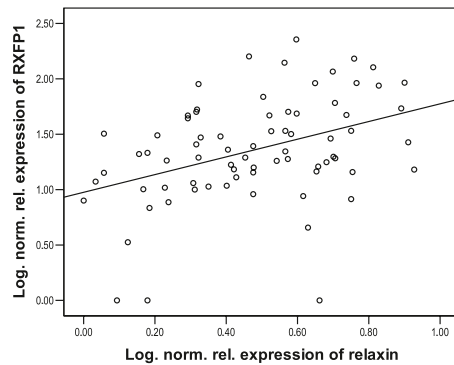


Figure 3. Logarithmic plotting of normalized relative expressions of all tumours. Expression of relaxin is correlated with relaxin family peptide receptor 1 (RXFP1) expression ($P < 0.001$, $R = 0.395$, $n = 74$).

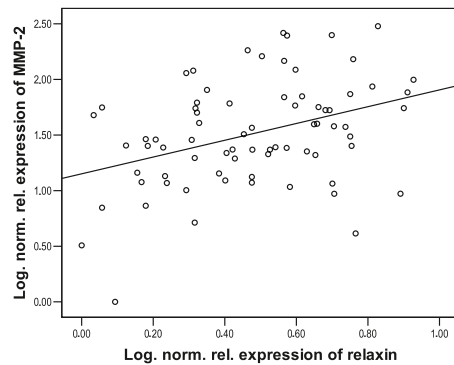


Figure 4. Logarithmic plotting of normalized relative expressions of all tumours. Expression of relaxin is correlated with matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) expression ($P = 0.004$, $R = 0.333$, $n = 74$).

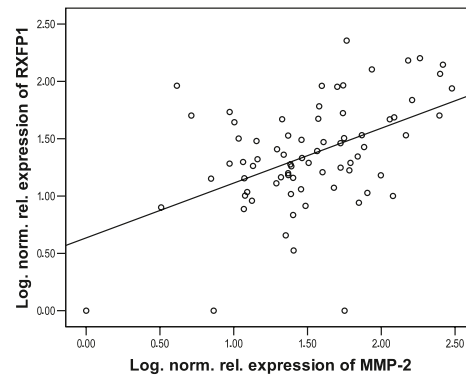


Figure 5. Logarithmic plotting of normalized relative expressions of all tumours. Expression of relaxin family peptide receptor 1 (RXFP1) is correlated with matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) expression ($P < 0.001$, $R = 0.408$, $n = 74$).

Table 2. Linear correlation analysis of relative matrix metalloproteinase (MMP) expressions

	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13
MMP-1	$P = 0.003$ $R = 0.340$	$P < 0.000$ $R = 0.622$	$P < 0.000$ $R = 0.555$	$P < 0.000$ $R = 0.459$
MMP-2	—	$P = 0.038$ $R = 0.241$	$P < 0.001$ $R = 0.443$	$P < 0.000$ $R = 0.440$
MMP-3	—	—	$P = 0.003$ $R = 0.346$	$P = 0.001$ $R = 0.379$
MMP-9	—	—	—	$P < 0.000$ $R = 0.527$

All MMPs are correlated positively with each other, except MMP-2 with MMP-3. This nonsignificant correlation is italicized.

to skin ulceration and tumour type, which could not predict metastases.

Another ROC-curve analysis for the prediction of death because of mammary cancer in the first year after surgery, including $n = 4$ cases of death

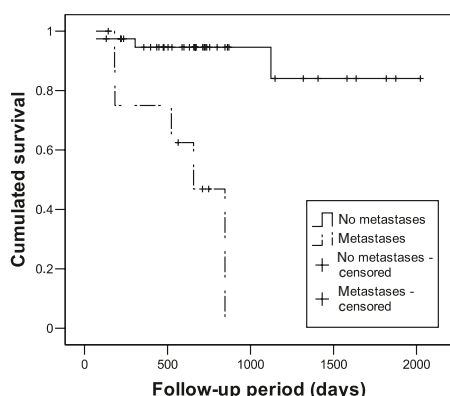


Figure 6. Kaplan-Meier plot of the cumulated survival after surgery. Female dogs with metastases ($n = 9$) have a significantly shorter survival than female dogs without detected metastases ($n = 39$; $P < 0.001$). All events that were not 'death due to mammary tumour' are censored.

in the first year, revealed MMP-2 as the best marker (AUC: 0.947) with sensitivity at 100% and specificity at 89.5% for a cut-off at 78.5 for relative expression (data not shown). A Cox regression analysis including $n = 8$ cases of death because of mammary tumour over the whole follow-up period and $n = 40$ censored cases showed that MMP-2 can be an independent marker ($P = 0.019$) with a relative hazard increase of 14.9 (95% confidence interval {1.6; 141.0}).

Nine tumour samples were analysed by immunohistochemistry: five samples were of a malignant type, whereas four samples contained only benign tumours.

An immunohistochemical examination of local production of relaxin and RXFP1 yielded positive signals in tumours as well as in areas of healthy mammary tissue for both genes. Relaxin protein expression was strong in subepithelial myoepithelium, with positive signals in all nine tumour samples (Fig. 7). An analysis of signal intensities of different histological types suggested that proliferating myoepithelium that had lost contact to the epithelial component had become relaxin negative, as shown in Fig. 8.

RXFP1 was mainly expressed in cells of epithelial origin and could be found in seven of nine tumours (Fig. 9). No connection could be found between RXFP-1 positive or negative epithelium and any specific tumour types.

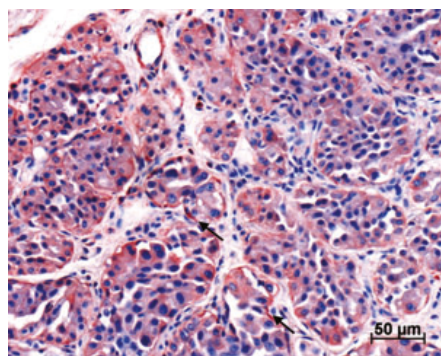


Figure 7. Patient 1. Solid carcinoma. Positive signals for relaxin (RLX) in the myoepithelial component of the carcinoma (arrows). Magnification: $\times 200$, nuclei counterstained with Maier's haematoxylin, primary antibody dilution 1:6000.

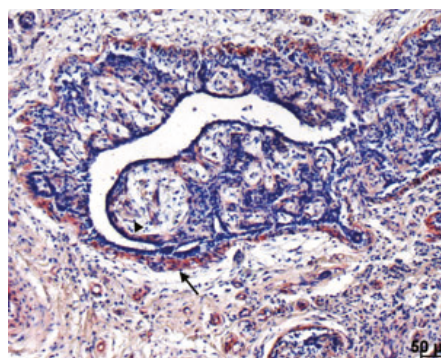


Figure 8. Patient 2. Complex ductal carcinoma. The subepithelial myoepithelium is positive for relaxin (RLX) (arrow), whereas the proliferating myoepithelium is RLX-negative (arrowhead). Magnification: $\times 100$, nuclei counterstained with Maier's haematoxylin, primary antibody dilution 1:6000.

Discussion

This study was designed to investigate the impact of relaxin and its receptors (RXFP1 and RXFP2) on connective tissue remodelling in terms of CMT invasiveness through MMP and to determine whether they can serve as markers for the early detection of metastases. In previous studies, systemic plasma relaxin did not have a prognostic value for metastases or survival in the dog,^{19,20} but relaxin is a tool for metastatic situations in women^{8,35} and has been reported to have an impact on the *in vitro* invasiveness of mammary tumour

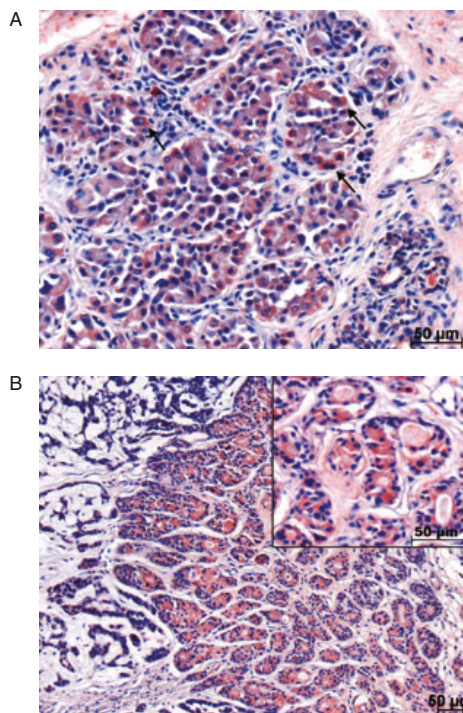


Figure 9. (A) Patient 1. Simple adenocarcinoma. Numerous epithelial cells are positive for relaxin family peptide receptor 1 (RXFP1) (arrows). Magnification: $\times 200$, nuclei counterstained with Maier's haematoxylin, primary antibody dilution 1:1200. (B) Patient 3. Large picture: carcinoma in chondroma (chondroma not visible in this picture). Small inset: Well-differentiated carcinoma. Epithelial cells of the well-differentiated carcinoma are RXFP-1-positive. Magnification: large picture, $\times 100$; small inset, $\times 200$. Nuclei counterstained with Maier's haematoxylin, primary antibody dilution 1:1200.

cells from women^{10,36} or dogs.⁶ Therefore, our analyses were focused on the local intratumoural production of relaxin, which can have paracrine or autocrine effects not exclusively affecting the plasma concentration.³⁷ However, according to the resulting data, local relaxin expression itself seems to have no prognostic abilities in the dog. At least, the evidence from mRNA detection and positive immunohistochemical signals from the myoepithelium suggest that neoplastic mammary tissue may be another site of relaxin synthesis besides the known sources; the ovaries and placenta.^{38–40}

The analysis of RXFP1 expression was promising, as it was also detected as mRNA and protein in

CMT. However, this is the first report about highly expressed relaxin and RXFP1 on gene and protein level in the neoplastic canine mammary gland. Moreover, RXFP1 mRNA could be discovered as a new marker for early detection of metastases and could become a putative target for a novel antimetastatic therapy in the dog. The RXFP1 mRNA expression presented as an independent marker with more than a 15-fold risk for metastases for patients over the study-specific cut-off. The survival of dogs with high RXFP1 expression was significantly reduced in the present analysis, supporting the prognostic relevance of RXFP1. This is paralleled by stage 3 patients showing higher RXFP1 expression than stage 1 patients, as a high TNM stage is also linked with poor prognosis.^{3,41,42}

Another relevant factor for prognosis in the present analysis was the intensity of MMP-2 mRNA expression. There was a decreased survival rate of patients with high MMP-2 expression and a difference in MMP-2 expression between stage 1 and stage 3 patients. So far, it is well known that several MMPs, such as MMP-2, MMP-3 and MMP-9, play an important role in the breakdown of the extracellular matrix for canine tumour invasiveness.^{14–18,43} In detail, MMP-2 is expressed in myoepithelial cells¹⁶ as well as carcinoma cells and fibroblasts^{13,14,16} of CMT. Various studies have described a higher protein expression of MMP-2 and MMP-9 in malignant CMT than in benign ones,^{14–18} which has been observed for MMP-1, MMP-3 and MMP-13, but was not confirmed for MMP-2 and MMP-9 by the present analysis of gene expression. However, these earlier studies underline the involvement of MMP-2 in crucial processes such as the invasion of surrounding tissue in CMT disease.

Therefore, RXFP1 and MMP-2 can be suggested as prognostic tools in the canine mammary gland. The induction of MMP-2 expression is a well-described feature of relaxin and has been reported in human breast cancer¹⁰ and human fibroblasts in various healthy tissues.^{44–47} Interestingly, relaxin, RXFP1 and MMP-2 form a ligand–receptor–effector pathway of colocalized proteins, leading to connective tissue remodelling and invasiveness, which can be activated by secreted

relaxin from the myoepithelium in a paracrine or autocrine manner as reflected by the positive correlations of all three gene expressions in CMT. In this context, an increased expression of the RXFP1 gene can be a response to intense receptor stimulation by relaxin, as described in human fetal membranes, placenta and endometrium before^{48,49} or a result of an autonomous up-regulation during tumour progression.

In our study, local relaxin gene expression was not linked with the plasma levels of circulating relaxin, which is in accordance to our earlier findings.¹⁹ It is likely not to be relaxin, but its receptor which is the main regulator of signal transduction in the relaxin system in CMT. Recent studies have shown that relaxin can induce cAMP signalling through an RXFP1-containing signalosome in subpicomolar doses,⁵⁰ which are below the detection level of current blood assays.²² RXFP1 has been reported to be present at very low levels in some *in vitro* systems expressing RXFP1 physiologically with ~ 250 receptors cell⁻¹ in THP-1 cells and ~ 2000 receptors cell⁻¹ in neonatal rat atrial fibroblasts.⁵¹ Therefore, even a few RXFP1 molecules more or less may have a great impact on the production of second messengers. This effect is amplified by the long-lasting signalling behaviour of RXFP1 after activation, which can be explained by poor internalization and a lack of β -arrestin in contrast to other G-protein-coupled receptors.^{51,52} Therefore, the regulation of receptor expression seems to be the major modulator for maintaining cell responsiveness towards relaxin; hence, the observed up-regulation of RXFP1 expression up to ~ 200 -fold is likely to cause a strong amplification of the local relaxin stimulus in CMT.

As a result of the presented findings, RXFP1 seems to be integrated in the early phase of the metastatic process. Therefore, the genesis of metastases can be detected much earlier than possible with long established methods, such as the histology of lymph nodes, radiography or sonography, as those are only able to describe existing metastases.

The presented data on RXFP1 expression would help to assess the metastatic potential of neoplasia for a better decision on the necessity of adjuvant chemotherapy or improve the accuracy

of a preoperative prognosis and to explore the reasonability of a subsequent surgical intervention. From the practical point of view, a preoperative analysis of early markers requires only a few milligram of tumour tissue, which can easily be obtained by biopsy or possibly by fine needle aspiration, as recommended just recently.⁵³

The cut-offs used are exclusive to this study, because they are based on relative quantifications of expressions, standardized as multiple intensities of the sample with the lowest expression according to recent recommendations.^{28,30,54,55} Prospectively, to use RXFP1 as a prognostic tool, a routine assay needs either a panel of validated standards to compute the relative expression of the tumour samples or a patient-specific reference tissue. In the latter case, the relative expression of the marker gene in the tumour has to be divided by the expression of the marker in the reference tissue after normalization of both with suitable reference genes. This tumour:reference ratio could be used as a standard-independent and therefore nonlaboratory-specific prognostic tool after sufficient evaluation in large-scale studies. Even the demonstrated immunohistochemical detection of RXFP1 can be applied in the routine pathological examination of CMT, but further evaluation is required.

It seems possible that RXFP1 could also become a therapeutic target for a novel adjuvant therapeutic approach, which has so far been applied not to canine mammary neoplasia, but to different cancer models. After relaxin and RXFP1 silencing through small interfering RNA or RXFP1 signalling suppression, Feng *et al.*⁵⁶ observed a decreased prostate carcinoma cell invasiveness and other encouraging positive effects *in vitro* and *in vivo*. Hossain *et al.*⁵⁷ also achieved a reduction of invasiveness in MCF-7 breast cancer cells with B-R13/17K H2 relaxin⁵⁸ as an antagonist of RXFP1.

Further, genes examined were lacking prognostic abilities. The fact that all the analysed peripheral plasma levels of progesterone, estradiol and relaxin showed neither any correlation with expression levels of the analysed parameters nor any prognostic relevance is in accordance with the published literature.^{3,19,20} Also, the prognostic relevance of ER and PR mRNA expression could not

be observed, although different authors described an improved survival rate in dogs with ER α - and PR-immunopositive CMT.⁵⁹ Interestingly, our present analysis indicated a coregulation of ER α and PR mRNA expression, as both expressions were highly correlated. This coregulation of both receptors has not been described at the gene level in CMT yet, but a recent study has found positive correlations between ER α and PR proteins using immunohistochemistry,⁶⁰ which is in contrast to earlier immunohistochemical studies.^{61,62} There may be methodical differences between results obtained by protein-detecting immunohistochemistry and mRNA-detecting molecular biological analysis because of posttranscriptional regulation and regulatory protein degradation.^{63–65} Therefore, further studies applying both methodologies to an identical panel of samples are needed to elucidate the regulation of both ER and PR in CMT.

The other genes analysed, such as RXFP2, MMP-1, MMP-3, MMP-9 and MMP-13 as well as ER β , could not be used as predictors of metastases or reduced survival. For MMP-3 and MMP-9 prognostic values have been described in CMT using immunohistochemistry or zymography,^{15–17,43} but the difference in technique may explain our current results as well. It seems likely that besides MMP-2 all the other MMP analysed are involved to some extent in connective tissue remodelling in CMT. Most of their expression intensities were correlated positively, which might reflect a general activation of matrix-degrading enzymes in several samples. However, the basement membrane-cleaving MMP-2 seems to be the most crucial MMP for metastases and survival rate, whereas the specific roles of the other MMPs in this process still have to be explored.

In conclusion, this study identified the main relaxin receptor, RXFP1, as a promising marker for metastatic processes in CMT, suggesting an involvement in the activation of connective tissue remodelling which is a prerequisite of invasiveness. Therefore, RXFP1 might become a target for a new antimetastatic therapy in CMT. Local relaxin gene expression or systemically circulating relaxin did not have any prognostic value, but further evidence of a local relaxin protein synthesis in CMT was confirmed using immunohistochemistry.

Analysing the expression of MMPs, MMP-2 seems to be the most relevant enzyme mediating CMT invasiveness. It may have prognostic abilities for survival and further evidence was found for the regulation of its expression being relaxin-dependent. Overall, the analysis of early metastatic markers through qRT-PCR can become a helpful tool for routine diagnosis of CMT, if certain basic requirements for sampling and assay design are considered.

Acknowledgements

The authors thank Ms J. Jakob, Mrs S. Tätzner, Dr J. Gottschalk, Mrs G. Lochmann, Dr A. Hahn, Dr J. Lamp, Mrs J. Volkery, Mrs M. Sohr, Mrs S. Troll, Mrs I. Urbansky, Mrs P. Herzog, Mrs P. Schleinitz, Mrs C. Pleitz and Mrs M. Wipplinger for technical assistance. This article is part of the PhD of O. L., who is granted by Studienstiftung des deutschen Volkes (German National Academic Foundation). This project was partly funded by Gesellschaft für kynologische Forschung GKF (A. E./S. B.) and Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG (German Research Foundation) (HO2512 / 1-1, K. U. H.; EI333/11-1, A. E.).

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Dorn CR, Taylor DON, Schneide R, Hibbard HH and Klauber MR. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties California II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute* 1968; **40**: 307–318.
2. Brodey RS, Goldschmidt MH and Roszel JR. Canine mammary-gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1983; **19**: 61–90.
3. Philibert JC, Snyder PW, Glickman N, Glickman LT, Knapp DW and Waters DJ. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2003; **17**: 102–106.
4. Misdorp W, Hellmen E, Else RW and Lipscomb TP. *Histological Classification of Mammary Tumors of*

- the Dog and the Cat*, 1st edn., Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1999.
5. Owen LN. *TNM Classification of Tumours in Domestic Animals*, 1st edn., Geneva, World Health Organization, 1980: 21–25.
6. Klopfeisch R, von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gaertner F and Gruber AD. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Veterinary Pathology* 2011; **48**: 98–116.
7. Rivera P and von Euler H. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Veterinary Pathology* 2011; **48**: 132–146.
8. Binder C, Simon A, Binder L, Hagemann T, Schulz M, Emons G, Trumper L and Einspanier A. Elevated concentrations of serum relaxin are associated with metastatic disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 2004; **87**: 157–166.
9. Silvertown JD, Geddes BJ and Summerlee AJ. Adenovirus-mediated expression of human prorelaxin promotes the invasive potential of canine mammary cancer cells. *Endocrinology* 2003; **144**: 3683–3691.
10. Binder C, Hagemann T, Husen B, Schulz M and Einspanier A. Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by up-regulation of matrix metalloproteases. *Molecular Human Reproduction* 2002; **8**: 789–796.
11. Radestock Y, Hoang-Vu C and Hombach-Klonisch S. Relaxin reduces xenograft tumour growth of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 2008; **10**: 15.
12. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A and Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003; **253**: 269–285.
13. Papparella S, Restucci B, Maiolino P and De VG. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary gland. *Journal of Comparative Pathology* 1997; **117**: 277–282.
14. Papparella S, Restucci B, Paciello O and Maiolino P. Expression of matrix metalloprotease-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. *Journal of Comparative Pathology* 2002; **126**: 271–276.
15. Yokota H, Kumata T, Taketaba S, Kobayashi T, Moue H, Taniyama H, Hirayama K, Kagawa Y, Itoh N, Fujita O, Nakade T and Yuasa A. High expression of 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) in canine mammary adenocarcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; **1568**: 7–12.
16. Hirayama K, Yokota H, Onai R, Kobayashi T, Kumata T, Kihara K, Okamoto M, Sako T, Nakade T, Izumisawa Y and Taniyama H. Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. *Journal of Comparative Pathology* 2002; **127**: 249–256.
17. Kawai K, Uetsuka K, Doi K and Nakayama H. The activity of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in mammary tumors of dogs and rats. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2006; **68**: 105–111.
18. Vinothini G, Balachandran C and Nagini S. Evaluation of molecular markers in canine mammary tumors: correlation with histological grading. *Oncology Research* 2009; **18**: 193–201.
19. Lamp O, Honscha KU, Jakob J, Lamp J, Schweizer S, Reischauer A, Gottschalk J, Hahn A, Ebert M, Rothemund S, Blaschzik S and Einspanier A. Investigation of the local expression of the relaxin system in canine mammary tumours. *Reproduction in Domestic Animals* 2009; **44**: 224–229.
20. Schweizer S, Lamp O, Reischauer A, Lamp J, Blaschzik S, Grevel V and Einspanier A. Investigation of the plasma relaxin levels in bitches with mammary gland tumours as a potential prognostic marker. *Reproduction in Domestic Animals* 2007; **42**(Suppl. 1): 29.
21. Clemente M, Perez-Alenza MD and Pena L. Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 2010; **143**: 157–163.
22. Einspanier A, Bunck C, Salpigidou P, Marten A, Fuhrmann K, Hoppen HO and Gunzel-Apel AR. Relaxin: ein wichtiger Graviditätsindikator bei der Hundin [Relaxin: an important indicator of canine pregnancy]. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 2002; **109**: 8–12.
23. Kaskous S, Gottschalk J, Hippel T and Grun E. The behavior of growth-influencing and steroid hormones in the blood plasma during pregnancy of Awassi sheep in Syria. *Berlin Munchner Tierärztliche Wochenschrift* 2003; **116**: 108–116.
24. Etschmann B, Wilcken B, Stoevesand K, von der Schulenburg A and Sterner-Kock A. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in canine mammary tumors using the GeNorm algorithm. *Veterinary Pathology* 2006; **43**: 934–942.
25. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R and Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* 2007; **35**: W71–W74.

26. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 1997; **25**: 3389–3402.
27. Pattyn F, Speleman F, De Paepe A and Vandesompele J. RTPPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Research* 2003; **31**: 122–123.
28. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ and Moorman AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 2009; **37**: e45.
29. Brinkhof B, Spee B, Rothuizen J and Penning LC. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Analytical Biochemistry* 2006; **356**: 36–43.
30. Andersen CL, Jensen JL and Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 2004; **64**: 5245–5250.
31. Ivell R, Balvers M, Pohnke Y, Telgmann R, Bartsch O, Milde-Langosch K, Bmberger AM and Einspanioer A. Immunoexpression of the relaxin receptor LGR7 in breast and uterine tissues of humans and primates. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003; **1**: 114. DOI: 10.1186/1477-7827-1-114.
32. Steinetz BG, Goldsmith LT, Hasan SH and Lust G. Diurnal-variation of serum progesterone, but not relaxin, prolactin or estradiol-17-beta in the pregnant bitch. *Endocrinology* 1990; **127**: 1057–1063.
33. Dschietzig T, Richter C, Bartsch C, Laule M, Armbruster FP, Baumann G and Stangl K. The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *FASEB Journal* 2001; **15**: 2187–2195.
34. Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Sherwood OD and Hsueh AJ. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* 2002; **295**: 671–674.
35. Pukrop T, Bleckmann A, Einspanier A and Binder C. Rapid progression of hormone receptor-negative breast cancer concomitant with ovarian stimulation-a paradoxon? *Annals of Oncology* 2009; **20**: 2020–2022.
36. Bani D, Riva A, Bigazzi M and Sacchi TB. Differentiation of breast-cancer cells in-vitro is promoted by the concurrent influence of myoepithelial cells and relaxin. *British Journal of Cancer* 1994; **70**: 900–904.
37. Klonisch T, Bialek J, Radestock Y, Hoang-Vu C and Hombach-Klonisch S. Relaxin-like ligand-receptor systems are autocrine/paracrine effectors in tumor cells and modulate cancer progression and tissue invasiveness. In: *Relaxin and Related Peptides*, 1st edn., Berlin, Springer-Verlag, 2007: 104–118.
38. Steinetz BG, Goldsmith LT, Harvey HJ and Lust G. Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy. *American Journal of Veterinary Research* 1989; **50**: 68–71.
39. Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Froehlich C, Kauffold J, Steger K, Steinetz BG and Fischer B. Canine preprorelaxin: nucleic acid sequence and localization within the canine placenta. *Biology of Reproduction* 1999; **60**: 551–557.
40. Tsutsui T and Stewart DR. Determination of the source of relaxin immunoreactivity during pregnancy in the dog. *Journal of Veterinary Medical Science* 1991; **53**: 1025–1029.
41. Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K and Sugiyama M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *Journal of Veterinary Medical Science* 1996; **58**: 1079–1083.
42. Bostock DE. Canine and feline mammary neoplasms. *British Veterinary Journal* 1986; **142**: 506–515.
43. Sorensen KC, Newman RG, Kitchell BE, Schaeffer DJ and Siegel AM. Isolation, characterization, and expression of stromelysin-1 in primary tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 2005; **66**: 1526–1535.
44. Unemori EN and Amento EP. Relaxin modulates synthesis and secretion of procollagenase and collagen by human dermal fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 1990; **265**: 10681–10685.
45. Unemori EN, Pickford LB, Salles AL, Piercy CE, Grove BH, Erikson ME and Amento EP. Relaxin induces an extracellular matrix-degrading phenotype in human lung fibroblasts in vitro and inhibits lung fibrosis in a murine model in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 1996; **98**: 2739–2745.
46. Palejwala S, Stein DE, Weiss G, Monia BP, Tortoriello D and Goldsmith LT. Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway. *Endocrinology* 2001; **142**: 3405–3413.
47. Henneman S, Bildt MM, Degroot J, Kuijpers-Jagtman AM and Von den Hoff JW. Relaxin stimulates MMP-2 and alpha-smooth

- muscle actin expression by human periodontal ligament cells. *Archives of Oral Biology* 2008; **53**: 161–167.
48. Lowndes K, Amano A, Yamamoto SY and Bryant-Greenwood GD. The human relaxin receptor (LGR7): expression in the fetal membranes and placenta. *Placenta* 2006; **27**: 610–618.
 49. Mazella J, Tang M and Tseng L. Disparate effects of relaxin and TGF beta 1: relaxin increases, but TGF beta 1 inhibits, the relaxin receptor and the production of IGFBP-1 in human endometrial stromal/decidual cells. *Human Reproduction* 2004; **19**: 1513–1518.
 50. Halls ML and Cooper DMF. Sub-picomolar relaxin signalling by a pre-assembled RXFP1, AKAP79, AC2, beta-arrestin 2, PDE4D3 complex. *EMBO Journal* 2010; **29**: 2772–2787.
 51. Callander GE, Thomas WG and Bathgate RAD. Prolonged RXFP1 and RXFP2 signaling can be explained by poor internalization and a lack of beta-arrestin recruitment. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2009; **296**: C1058–C1066.
 52. Kong RCK, Shilling PJ, Lobb DK, Gooley PR and Bathgate RAD. Membrane receptors: structure and function of the relaxin family peptide receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010; **320**: 1–15.
 53. Simon D, Schoenrock D, Nolte I, Baumgartner W, Barron R and Mischke R. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Veterinary Clinical Pathology* 2009; **38**: 521–528.
 54. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J and Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 2009; **55**: 611–622.
 55. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A and Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002; **3**: research0034.1–0034.11
 56. Feng S, AgoulNIK IU, Bogatcheva NV, Kamat AA, Kwabi-Addo B, Li R, Ayala G, Ittmann MM and AgoulNIK AI. Relaxin promotes prostate cancer progression. *Clinical Cancer Research* 2007; **13**: 1695–1702.
 57. Hossain MA, Samuel CS, Binder C, Hewitson TD, Tregear GW, Wade JD and Bathgate RAD. The chemically synthesized human relaxin-2 analog, B-R13/17K H2, is an RXFP1 antagonist. *Amino Acids* 2010; **39**: 409–416.
 58. Silvertown JD, Symes JC, Neschadim A, Nonaka T, Kao JCH, Summerlee AJS and Medin JA. Analog of H2 relaxin exhibits antagonistic properties and impairs prostate tumor growth. *FASEB Journal* 2007; **21**: 754–765.
 59. Chang CC, Tsai MH, Liao JW, Chan JPW, Wong ML and Chang SC. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2009; **235**: 391–396.
 60. Manee-in S, Srisuwatanasagul S, Lohachit C and Sirivaidyapong S. The number of ER α and PR in the mammary glands of bitches with and without tumor mass using immunohistochemical assay. *Comparative Clinical Pathology* 2009; **18**: 221–227.
 61. Martin de Las Mulas J, Millan Y and Dios R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology* 2005; **42**: 200–212.
 62. Nieto A, Pena L, Perez-Alenza MD, Sanchez MA, Flores JM and Castano M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Veterinary Pathology* 2000; **37**: 239–247.
 63. Alarid ET, Bakopoulos N and Solodin N. Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Molecular Endocrinology* 1999; **13**: 1522–1534.
 64. Lange CA, Shen TJ and Horwitz KB. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; **97**: 1032–1037.
 65. Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL and O'Malley BW. Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; **96**: 1858–1862.

4 Diskussion

Mammatumoren gehören zu den häufigsten Tumoren der Hündin (SCHNEIDER et al. 1969; RUTTEMAN 2005) und sind eine häufige Todesursache (SIMON et al. 2001). Bis zu 50% aller malignen CMT bilden Metastasen (BOSTOCK 1975), wodurch die Prognose sehr verschlechtert wird. Denn bislang ist für den Hund im Gegensatz zum Menschen keine antimetastatische Chemotherapie etabliert (SIMON et al. 2006). Die präoperative Absiedlung von Tumorzellen aus malignen Tumoren oder der Verbleib von Zellen im Tumorbett sind somit immer Risikofaktoren für ein vorzeitiges Versterben des Patienten. Ein besonderer Schwerpunkt in der Forschung zu CMT liegt daher in der Früherkennung des metastatischen Potentials eines Tumors und der Entwicklung neuer Möglichkeiten zur Verhinderung einer Metastasierung. Das Peptidhormon Relaxin ist hierbei ein potentieller Einflussfaktor in der Steuerung von Invasivität und Metastasierung. So wurde sowohl bei caninen Mammatumorzellen (SILVERTOWN et al. 2003) als auch bei humanem Brustkrebs *in vitro* wie auch *in vivo* (BINDER et al. 2002; BINDER et al. 2004) ein Zusammenhang zwischen Relaxin und erhöhter Invasivität beschrieben. Bei der CMT-Erkrankung der Hündin konnten SCHWEIZER (2010) für die Blutkonzentration von Relaxin keine prognostische Verwertbarkeit finden, so dass der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der intratumoralen Expression von Relaxin, seinen Rezeptoren und den für die Metastasierung essentiellen MMP liegen sollte.

Zu diesem Zweck wurden CMT-Gewebeproben von Hündinnen mit dokumentierter Krankengeschichte molekularbiologisch mittels qRT-PCR, teilweise auch mit Hilfe immunhistochemischer Methoden, auf die Expression der Faktoren des Relaxinsystems, ausgewählter MMP und der Steroidhormonrezeptoren, ER α , ER β und PR, untersucht. Die quantitativen Expressionsintensitäten wurden sowohl auf Beziehungen zueinander als auch auf mögliche Verknüpfungen mit den systemischen Hormonkonzentrationen geprüft und ihre prognostische Aussagekraft mittels Multivarianzanalyse bewertet. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in zwei Fachartikeln publiziert (LAMP et al. 2009, LAMP et al. 2011).

Als Hauptegebnisse sind folgende Resultate anzusehen:

1. Relaxin und seine Rezeptoren werden im CMT exprimiert.
2. Die Relaxinsystem- und die MMP-2-Expression im CMT sind eng korreliert.
3. RXFP1 besitzt prognostischen Wert zur Vorhersage von Metastasierung.

Im Folgenden sollen diese Ergebnisse sowie die weiteren Schlussfolgerungen diskutiert werden.

In beiden Veröffentlichungen konnte mittels Real-time RT-PCR auf mRNA-Ebene die Expression von Relaxin und seinem Hauptrezeptor RXFP1 im CMT-Gewebe demonstriert werden (LAMP et al. 2009; LAMP et al. 2011). Im zweiten Abschnitt der Studie (LAMP et al. 2011) wurde sowohl RLX als auch RXFP1 immunhistologisch auf Ebene der funktionellen Proteine im CMT-Gewebe nachgewiesen. Für das neoplastische Mammagewebe konnte damit die von verschiedenen Autoren postulierte Expression von Relaxin im caninen Mamma- und Mammatumorgewebe (GOLDSMITH et al. 1994; SILVERTOWN et al. 2003) bestätigt werden. Auch die mRNA-Expression von RXFP2 als einem weiteren Relaxin affinen Rezeptor konnte in 44 der 74 Proben (59,5%) gezeigt werden. Jedoch ist auch für CMT anzunehmen, dass RXFP1 der bedeutende Rezeptor für die Relaxin-Signaltransduktion ist, da dieser Rezeptor laut Bathgate et al. (2006) allgemein eine höhere Affinität für Relaxin aufweist als RXFP2 und im Gegensatz zu RXFP2 in allen Proben nachweisbar war.

Somit exprimiert der CMT das gesamte Relaxinsystem bestehend aus Ligand und Rezeptor. Dadurch kann der Tumor nicht nur auf endokrin wirkendes Relaxin aus bekannten Quellen wie dem Gelbkörper (MARTIN et al. 2009) reagieren, sondern auch entsprechend den Ergebnissen für verschiedene humane Tumoren von KLONISCH et al. (2007) eine eigenständige para- oder autokrine Stimulation nachgeordneter Signalwege erreichen. Dadurch könnte der CMT beispielsweise Enzyme des Bindegewebsabbaus aktivieren und damit autonom Invasivität induzieren.

Die Fähigkeit des Relaxins, MMP als die zentralen Bindegewebsmodulatoren (WOODHOUSE et al. 1997) zu aktivieren, ist sowohl aus physiologischen Geweben (TOO et al. 1984; UNEMORI und AMENTO 1990; PALEJWALA et al. 2001; HENNEMAN et al. 2008) als auch aus Neoplasien der Milchdrüse bei Mensch und Hund (BINDER et al. 2002, SILVERTOWN et al. 2003) bekannt. Die immunhistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben dabei gezeigt, dass RXFP1 vorwiegend in epithelialen Zellen des CMT exprimiert wird (LAMP et al. 2011) und damit in dem gleichen Zelltyp, in dem für maligne CMT auch die Expression von MMP-2 und MMP-9 beschrieben wurde (PAPPARELLA et al. 1997; HIRAYAMA et al. 2002; PAPPARELLA et al. 2002). Somit ist anzunehmen, dass die MMP-exprimierenden epithelialen Tumorzellen durch die gleichzeitige Expression von RXFP1 für Relaxin sensibel sind. Dies unterstützt ebenfalls die Hypothese, dass Relaxin dem Tumor zur autonomen Stimulation von Invasivität dienen kann.

Dass im CMT tatsächlich ein Zusammenhang zwischen Relaxin, RXFP1 und Enzymen des Bindegewebsumbaus besteht, legen die Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalyse nahe, in der lineare Korrelationen zwischen dem Relaxinsystem und MMP-2 demonstriert werden konnten (LAMP et al. 2009; LAMP et al. 2011).

Das Hauptziel dieser Arbeit lag in der Identifikation früher Metastasemarkers, die früher als andere Methoden ein Metastasierungspotential anzeigen können. Dies dient zum Einen der rechtzeitigen Erkennung von besonders aggressiven Tumoren, bevor diese Metastasen gebildet haben. Zum Anderen soll mittels dieser Marker in Zukunft die Notwendigkeit einer antimetastatischen Therapie besser abschätzbar sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expressionsintensität von RXFP1 ein früher, unabhängiger prognostischer Marker für Metastasierung ist (LAMP et al. 2011). Eine hohe RXFP1-Expression über dem *Cut-off* zeigte ein um Faktor 15 erhöhtes Risiko für eine Metastasierung an (LAMP et al. 2011). Das bedeutet, dass es trotz der Entfernung des Tumors vermehrt zu einer Metastasenbildung kam, weil sich bereits Zellen abgesiedelt hatten, während jedoch die Lunge zum Zeitpunkt der Tumorexzision noch radiologisch unauffällig war.

Die Bedeutung von RXFP1 für den Verlauf einer CMT-Erkrankung wird unterstützt durch die parallele Beobachtung, dass Patienten mit hoher RXFP1-Expression eine signifikant verminderte Überlebenszeit aufwiesen und auch Patienten im prognostisch ungünstigen Stadium 3 (OWEN 1980; PHILIBERT et al. 2003) höhere RXFP1-Expressionen zeigten als Patienten im Stadium 1 (LAMP et al. 2011). RXFP1 kommt demzufolge wahrscheinlich eine zentrale Stellung bei der Vermittlung der Invasivität fördernden Relaxinwirkung zu.

Folgende Besonderheiten unterstreichen dabei die Schlüsselposition dieses Rezeptors:

1. RXFP1 liegt in Form eines Signalosoms vor, das auf kleinste Relaxinkonzentrationen reagieren kann.
2. RXFP1 zeigt eine lang anhaltende Aktivierung, die zu einer starken Signalamplifikation führt.
3. Die Zahl der exprimierten RXFP1 Moleküle in den bislang untersuchten Zelltypen ist auffallend niedrig.

HALLS und COOPER (2010) konnten zeigen, dass RXFP1 in Form eines bisher einzigartigen Signalosoms, einem Zusammenschluss von Rezeptor und nachgeschalteten Signalgeber-Molekülen für die intrazelluläre Weiterleitung wie Adenylatcyclase und Phosphodiesterase auf engstem

Raum, vorliegt. Dieses Signalosom ist in der Lage auf sub-pikomolare Dosen von Relaxin die nachgeschaltete *Second-Messenger*-Kaskade zu aktivieren (HALLS und COOPER 2010). Bei der intratumoralen Relaxinsignalkaskade ist davon auszugehen, dass im umgebenden Milieu der Relaxin sezernierenden Zelle höhere Relaxinkonzentrationen bestehen, die mit zunehmender Entfernung durch Verdünnung weiter abnehmen und sich so dem Nachweis durch Blutuntersuchungen entziehen (KLONISCH et al. 2007). Das hochsensitive RXFP1-Signalosom ermöglicht damit möglicherweise eine parakrine Zell-Zell-Kommunikation mit streng limitierter Reichweite, die bereits auf kleine Konzentrationsveränderungen reagieren kann. Unter dieser Annahme ist es verständlich, dass die systemischen Relaxinspiegel von der lokalen Relaxinexpression im Tumor unabhängig waren (LAMP et al. 2009; LAMP et al. 2011). Dies würde zudem erklären, warum die systemischen Relaxinspiegel prognostisch für die CMT-Erkrankung bedeutungslos waren (LAMP et al. 2009; SCHWEIZER 2010; LAMP et al. 2011).

Neben der hohen Sensitivität ist die lange Aktivierungsdauer von RXFP1 hervorzuheben. RXFP1 bleibt über viele Minuten bis Stunden aktiv, was für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren untypisch ist und zu einer deutlichen intrazellulären Signalamplifikation führt (CALLANDER et al. 2009; KERN und BRYANT-GREENWOOD 2009). Bei anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird die Signalweiterleitung im Allgemeinen durch die Internalisierung und enzymatische Inaktivierung des Rezeptors kurz nach seiner Aktivierung schon wieder beendet, so dass es nur zu einer kurzen aktiven Phase der Signalgebung kommt (CALLANDER et al. 2009; KERN und BRYANT-GREENWOOD 2009). Das hiervon abweichende Aktivierungsverhalten von RXFP1 ist besonders wichtig, wenn man bedenkt, dass die Zahl der RXFP1-Moleküle in den bisher untersuchten Zelllinien von Mensch und Ratte weitaus geringer ist als bei den meisten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (CALLANDER et al. 2009). Dies legt nahe, dass das Niveau der RXFP1-Expression physiologisch als niedrig anzusehen ist. So können nach einer Expressionssteigerung bereits wenige weitere Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche eine erhebliche Aktivitätssteigerung nachgeschalteter Signalwege verursachen. Für RXFP1-Moleküle ist damit nicht die Internalisierung von aktivierten Rezeptoren der wichtigste Regler für die Empfindlichkeit einer Zelle auf Relaxin, sondern die Rezeptorprotein-Expression, so dass diese mittels Expressionsanalyse diagnostisch gut zu erfassen ist. In der vorliegenden Arbeit wurden dabei deutliche Unterschiede bis Faktor 200 in der RXFP1-Expression der CMT-Proben gemessen (LAMP et al. 2011). Dies führte wahrscheinlich zu einer erheblichen Signalverstärkung in stark RXFP1-exprimierenden CMT bei gleicher Relaxinkonzentration gegenüber CMT mit niedrigerer RXFP1-Expression.

Die Erforschung von RXFP1 *in vivo* befindet sich, insbesondere beim Hund, noch in den Anfängen, so dass keine weiteren Studien zur Expression von RXFP1 im CMT bekannt sind und auch für andere Erkrankungen von Hund und Mensch RXFP1 bislang nicht als Prognostikum herangezogen wurde. Andere Studien zu molekularen Markern in CMT haben sich bisher vorwiegend mit der Prognose der Überlebenszeit beschäftigt (KLOPFLEISCH et al. 2011; RIVERA und VON EULER 2011). Lediglich die Arbeit von KLOPFLEISCH et al. (2010) konnte anhand des Expressionsmusters zahlreicher unterschiedlicher Gene metastatische von nicht-metastatischen Tumoren unterscheiden. Allerdings lieferten die Autoren keine Bewertung der Vorhersagesicherheit mittels Varianzanalyse.

Die Expression von RXFP1 hingegen scheint nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (LAMP et al. 2011) ein unabhängiger molekularer Metastasemarker zu sein, der sowohl die Planung eines rein chirurgischen Vorgehens als auch die Entscheidung, ob eine adjuvante Chemotherapie angeraten ist, verbessern kann. Dabei sind die vorgestellten Ergebnisse als erste Orientierung zu verstehen, da bislang lediglich retrospektiv anhand des klinischen Verlaufs der Zusammenhang von RXFP1-Expression und Metastasierung oder Überleben beobachtet wurde. Noch völlig offen ist die Frage, ab wann RXFP1 das metastatische Potential anzeigen kann und wie viel Zeit noch bis zur tatsächlichen Streuung von Tumorzellen bleibt. Zur Klärung wäre zum Einen die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der RXFP1-Expression während der Tumorentwicklung und zum Anderen die kontrollierte Anwendung einer RXFP1 basierten Tumorchirurgie im Rahmen einer prospektiven klinischen Studie notwendig.

Zur Beurteilung der RXFP1-Expression kommen grundsätzlich beide in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden, die qRT-PCR und die Immunhistochemie in Frage.

Die Messung der Genexpressionsintensität mittels qRT-PCR bietet dabei den Vorteil der hohen Standardisierbarkeit durch Referenzgene und ein unmittelbares objektives quantitatives Ergebnis. Demgegenüber ist die Immunhistochemie weniger standardisierbar, da die Färbeintensität in der klassischen Auswertung durch einen Untersucher auch im besten Falle nur semi-quantitativ, aber immer subjektiv eingeschätzt werden kann. Die Immunhistochemie ist jedoch die besser etablierte Methode in der pathologischen Untersuchung, so dass eine Überprüfung der prognostischen Eignung auch für das RXFP1-Protein erstrebenswert ist. In den eigenen Untersuchungen (LAMP et al. 2011) fanden sich jedoch keine Hinweise auf eine Änderung des Expressionsortes von RXFP1, so dass eine eventuelle prognostische Information mit großer Wahrscheinlichkeit in einer geänderten Expressions- respektive Färbeintensität in den epithelialen Tumorzellen zu suchen ist. Die

vorliegende explorative Arbeit hatte hierbei zum Ziel grundsätzliche Zusammenhänge aufzuzeigen und auf ihre mögliche Verwertbarkeit zu prüfen, jedoch nicht eine Methode zur Praxisreife zu entwickeln. Bevor RXFP1 in der Praxis als Parameter verwendet werden kann, bedarf es selbstverständlich einer weiteren Evaluierung an einem größeren Patientenkontingent, sowie im Falle der qRT-PCR einer Etablierung einer studienunabhängigen Expressionsquantifizierung, wie im zweiten Abschnitt der Arbeit dargelegt (LAMP et al. 2011).

Ergänzend zur prognostischen Nutzung von RXFP1 eröffnet die vorliegende Arbeit auch im Bereich der medikamentellen Therapie des CMT neue Perspektiven, denn es existieren bereits vielversprechende Ansätze RXFP1 therapeutisch zu nutzen. So konnten durch Ausschaltung der Relaxin- oder RXFP1-Expression oder Unterdrückung des RXFP1-Signalweges unter Anderem eine Verminderung der Invasivität von humanen Prostatakarzinomzellen beobachtet werden (FENG et al. 2007). Eine andere Arbeit erreichte durch Einsatz eines RXFP1-Antagonisten eine Verminderung der Invasivität von humanen Brustkrebszellen (HOSSAIN et al. 2010). Die vorliegende Arbeit (LAMP et al. 2011) liefert somit nicht nur die Grundlage für einen neuartigen Therapieansatz für den Mammatumor des Hundes, sondern auch für den Einsatz des Hundes als *in vivo*-Modell für die Therapie des humanen Brustkrebses mittels RXFP1-Modulation.

Neben der prognostischen Eignung von RXFP1 zeigte sich, dass auch die Expressionsintensität von MMP-2 prognostisches Potential hat. Die vorliegende Arbeit ergab, dass die mRNA-Expression von MMP-2 ein unabhängiger Marker für das Versterben infolge des CMT sein kann (LAMP et al. 2011). Im CMT ist MMP-2 eines der wichtigsten Enzyme für die Auflösung der extrazellulären Matrix, die erst invasives Verhalten und damit Metastasierung ermöglicht (YOKOTA et al. 2001; HIRAYAMA et al. 2002; PAPPARELLA et al. 2002; SORENSEN et al. 2005; KAWAI et al. 2006; VINOTHINI et al. 2009). Patienten mit hoher mRNA-Expression von MMP-2 hatten ein höheres Risiko aufgrund ihres CMT zu versterben (LAMP et al. 2011). Der deutliche Zusammenhang von Metastasierung und kurzer Überlebenszeit im Patientengut (LAMP et al. 2011) unterstreicht die Bedeutung der Metastasen und damit der die Metastasierung ermöglichenden Enzyme für die Prognose des CMT-Patienten.

Trotz der engen Kopplung von Proteinexpression oder enzymatischer Aktivität bestimmter MMP und der Malignität eines CMT (YOKOTA et al. 2001; HIRAYAMA et al. 2002; PAPPARELLA et al. 2002; SORENSEN et al. 2005; KAWAI et al. 2006; VINOTHINI et al. 2009), wurde bisher lediglich über die prognostische Eignung von im Blutserum von erkrankten Hunden messbarem MMP-9-Protein berichtet (YOKOTA et al. 2001). MMP-2 ist damit das zweite Enzym der MMP-Familie, das

eine prognostische Aussagekraft bei der CMT-Erkrankung besitzen könnte. Allerdings bedarf dies der weiteren Abklärung durch Untersuchung einer größeren Patientenzahl.

Die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit beziehen sich auf die Analyse der Plasmahormonkonzentrationen von Relaxin, Östradiol und Progesteron sowie auf die weiteren molekularbiologisch untersuchten MMP und die Steroidhormonrezeptoren ER und PR.

Beide Untersuchungen ergaben, dass sich sowohl die Plasmakonzentrationen von Relaxin als auch von Östradiol und Progesteron nicht als prognostisches Kriterium eignen (LAMP et al. 2011). Zudem scheinen keine Beziehungen zwischen Hormonkonzentrationen im Plasma und der lokalen Expression der untersuchten Gene zu bestehen (LAMP et al. 2009, LAMP et al. 2011). Diese Ergebnisse sind analog zu den Schlussfolgerungen von SCHWEIZER (2010), der keine prognostische Eignung von Relaxin für CMT ausmachen konnte. Somit scheinen die Beobachtungen von BINDER et al. (2004) in Bezug auf Relaxin als geeignetem Marker für humane Mammatumoren nicht auf den Hund übertragbar zu sein. Wahrscheinlicher ist, dass die Relaxinsignalwirkung, wie bereits zuvor dargelegt, auf die Induktion von MMP im CMT para- oder autokrin erfolgt und damit unabhängig von Relaxinquellen wie dem Gelbkörper (STEINETZ et al. 1990; MARTIN et al. 2009). Im Umkehrschluss ist auch zu vermuten, dass die lokale Relaxinexpression im CMT keinen messbaren Einfluss auf die Relaxinkonzentration im Plasma hat, was die Hypothese der intratumoralen Signalkette zusätzlich stärkt. Diese Vermutung wird auch durch die Untersuchungen von SCHWEIZER (2010) gestützt, der keine signifikanten Unterschiede im Plasmarelaxinspiegel vor und zu mehreren Zeitpunkten nach der Tumorentfernung feststellen konnte.

Die Beobachtung, dass Östradiol und Progesteron keinen prognostischen Wert zu haben scheinen, wäre zum Einen dadurch erklärbar, dass beide Hormone als bedeutend bei der Tumorentstehung und weniger bei der Progression eines bestehenden Tumors angesehen werden (BRODEY et al. 1983; BOSTOCK 1986; MORRIS et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen manifeste CMT und keine in der frühen tumorösen Transformation befindlichen Mammagewebe untersucht. Zum Anderen war es nicht möglich den exakten Zyklusstand der Hündinnen rückwirkend zu ermitteln, so dass ein Vergleich hormonell ähnlicher Situationen nur bei den zwölf kastrierten Hündinnen stattfinden konnte. Durch diese geringe Fallzahl ist die Aussagekraft der Untersuchung in diesem Aspekt kritisch zu bewerten und sollte mit geeigneterem Studienaufbau verifiziert werden. Vergleichbare Arbeiten zum prognostischen Wert beider Steroidhormone beim Hund sind

nicht bekannt. Jedoch beschreiben einige Studien (QUEIROGA et al. 2005; ILLERA et al. 2006) erhöhte Östradiolkonzentrationen in Serum und CMT-Gewebehomogenisaten von Hündinnen mit malignen CMT gegenüber benignen CMT und gesunden Kontrollgeweben. QUEIROGA et al. (2005) vermuten sogar eine auto- oder parakrine Funktion lokal im CMT produzierter Steroidhormone. Dies würde analog zu der für Relaxin geäußerten Hypothese bedeuten, dass die Serumkonzentrationen der beiden Steroidhormone nicht die intratumorale Situation widerspiegeln, da im CMT andere, durch lokale Synthese und Metabolisation bestimmte Konzentrationen bestehen (MARINELLI et al. 2004; QUEIROGA et al. 2005; ILLERA et al. 2006). Dies hätte wiederum zur Folge, dass auch die systemischen Steroidhormonspiegel wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben (LAMP et al. 2011) für die lokale Expression der untersuchten Gene im Tumor ohne Bedeutung wären.

Bemerkenswert ist die beobachtete Korrelation von ER α - und PR-Expression (LAMP et al. 2011), die auch von MANEE-IN et al. (2009) nach immunhistologischer Analyse von CMT beobachtet wurde und als Ko-Regulation beider Rezeptoren gedeutet werden kann. Demgegenüber stehen allerdings die Ergebnisse der immunhistologischen Arbeit von NIETO et al. (2000), die keinen Zusammenhang zwischen beiden Expressionen finden konnten. Da sich auch die beiden immunhistologischen Arbeiten aufgrund von Methodenunterschieden nicht direkt vergleichen lassen, steht eine abschließende Bewertung dieses Aspektes noch aus.

Neben dem scheinbar eng mit dem Relaxinsystem verknüpften MMP-2 waren auch weitere MMP, namentlich MMP-1, -3, -9 und MMP-13, in nahezu allen Proben molekularbiologisch nachweisbar. Ihre Bedeutung für die Invasivität von Mammatumoren bei Hund und Mensch ist in zahlreichen Studien gezeigt worden (YOKOTA et al. 2001; BINDER et al. 2002; HIRAYAMA et al. 2002; KAWAI et al. 2006; VINOTHINI et al. 2009). Ein häufig beobachtetes Phänomen war, dass maligne Tumoren mehr MMP-2- und MMP-9-Protein exprimierten als benigne (YOKOTA et al. 2001; HIRAYAMA et al. 2002; PAPPARELLA et al. 2002; KAWAI et al. 2006; VINOTHINI et al. 2009). Zwar konnte diese Beobachtung durch die molekularbiologische Analyse für MMP-2 und -9 nicht bestätigt werden (LAMP et al. 2011), analoge Situationen lagen jedoch bei den MMP-1, -3 und -13 vor (LAMP et al. 2011). Diese höhere MMP-Expression in malignen Tumoren könnte als Ausdruck einer allgemeinen Aktivierung des Bindegewebsabbaus verstanden werden. Der Abbau der extrazellulären Matrix ermöglicht malignen Tumoren erst ihr invasives Verhalten und ist ein entscheidender Schritt in Richtung der Metastasierung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der vorliegenden Arbeit drei neue Aspekte zur Rolle des Relaxinsystems im CMT bezüglich autonomer Regulation, Prognostik und Therapie beschrieben werden konnten: Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Relaxin als auch seine Rezeptoren, RXFP1 und RXFP2, im CMT exprimiert werden. Dabei ist die mRNA-Expression von Relaxin, RXFP1 und MMP-2 miteinander korreliert und räumlich kolokalisiert, so dass im CMT eine auto- oder parakrine Steuerung von Invasivität möglich scheint. Eine prognostische Bedeutung hat hier vermutlich RXFP1, weil gesteigerte mRNA-Expressionsintensitäten mit hohem Metastasierungsrisiko und verkürzter Überlebenszeit einhergehen. In aktuellen humanmedizinischen Untersuchungen konnte RXFP1 als Ansatzpunkt für eine neuartige antimetastatische Therapie genutzt werden. In dieser Arbeit konnte RXFP1 erstmals im CMT nachgewiesen werden, so dass RXFP1-basierte Tumorthérapien möglicherweise auch für den Hund anwendbar sind. Zudem könnte sich der Hund damit als Modell für diese moderne Therapie des humanen Brustkrebses eignen.

5 Zusammenfassung

Ole Lamp

Untersuchung biochemischer Marker für Diagnostik und Prognose am Mammatumor der Hündin

Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Dezember 2011

59 Seiten, 2 Publikationen, 1 Abbildung, 0 Tabellen, 176 Literaturangaben, 3 Anhänge

Schlüsselwörter: Hund, Mammatumor, Metastase, Prognose, PCR

Canine Mammatumoren (CMT) sind eine der häufigsten Todesursachen bei Hündinnen (SIMON et al. 2001). Durch ihre periphere Lage sind zumeist nicht die Primärtumoren, sondern ihre Metastasen lebensbedrohlich, da diese häufig wichtige Organe wie Lunge Herz und Gehirn befallen (CLEMENTE et al. 2010). Aktuell angewandte Untersuchungsmethoden zur Erkennung von Metastasierung können entweder das invasive Wachstum beschreiben oder bereits bestehende Metastasen detektieren, jedoch fehlen bislang molekulare Marker, die frühzeitig und zuverlässig das metastatische Potential eines CMT anzeigen bevor Metastasen aufgetreten sind. Das Peptidhormon Relaxin ist in zahlreichen physiologischen und pathologischen Situationen beim Menschen als ein Induktor von Matrixmetalloproteinasen (MMP) bekannt (TOO et al. 1984; UNEMORI und AMENTO 1990; PALEJWALA et al. 2001; BINDER et al. 2002; KLONISCH et al. 2007; HENNEMAN et al. 2008). MMP sind Schlüsselenzyme des Bindegewebsabbaus, der jeder Metastasierung vorausgehen muss (WOODHOUSE et al. 1997). Bei der Frau ist im Blut messbares Relaxin ein Marker für metastatischen Brustkrebs (BINDER et al. 2004), für die Hündin scheint dagegen der Relaxinblutspiegel nicht aussagekräftig zu sein (SCHWEIZER 2010). Möglicherweise wird aber Relaxin lokal im caninen Mammagewebe exprimiert wie von GOLDSMITH et al. (1994) und SILVERTOWN et al. (2003) postuliert, so dass es wie in humanen Tumoren auto- oder parakrin Invasivität und Metastasierung (KLONISCH et al. 2007) fördern könnte. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die intratumorale Expression des Relaxins und seiner Rezeptoren sowie bekannter Faktoren des Bindegewebsabbaus untersucht und auf ihre prognostische Eignung überprüft werden.

In zwei Studienabschnitten (LAMP et al. 2009; LAMP et al. 2011) wurden CMT-Gewebeproben von n=31 (LAMP et al. 2009) respektive n=59 Hündinnen (LAMP et al. 2011) mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) auf ihre Expression von Relaxin,

seinen Rezeptoren, RXFP1 und RXFP2, sowie den Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2, -3, -9 und MMP-13, den Östradiolrezeptoren, ER α und ER β , und dem Progesteronrezeptor (PR) analysiert.

In beiden Studienabschnitten wurden die Plasmakonzentrationen der Hormone Relaxin, Östradiol und Progesteron auf mögliche Zusammenhänge mit der lokalen Genexpression überprüft. Im zweiten Studienabschnitt (LAMP et al. 2011) wurde darüber hinaus die Expression von Relaxin und RXFP1 auch immunhistologisch an n=9 CMT-Proben untersucht und in einer Multivarianzanalyse die prognostische Eignung aller untersuchten Parameter getestet.

Die Expressionsanalyse konnte zeigen, dass CMT sowohl ein bisher unbekannter Ort der Relaxinexpression beim Hund sind als auch den Hauptrezeptor des Relaxins, RXFP1, exprimieren. Diese Ergebnisse der mRNA-Untersuchung ließen sich immunhistologisch bestätigen. Darüber hinaus ergab die immunhistologische Untersuchung, dass Relaxin vorwiegend im myoepithelialen Anteil der untersuchten CMT exprimiert wird. In den epithelialen CMT-Zellen fand sich die stärkste RXFP1-Reaktivität, so dass RXFP1 mit der von anderen Autoren beschriebenen MMP-2- und MMP-9-Expression in epithelialen Zellen kolokalisiert ist (PAPPARELLA et al. 1997; HIRAYAMA et al. 2002; PAPPARELLA et al. 2002).

Die quantitativen Expressionsanalysen zeigten Korrelationen der Expressionsintensitäten von Relaxin, RXFP1 und MMP-2 auf. Die RXFP1 Expression war in dieser Studie sogar ein unabhängiger Marker für Metastasierung mit einem 15-fach höheren Risiko für Metastasierung für Patienten mit einer Expression oberhalb des studienspezifischen Cut-Offs. Alle untersuchten lokalen Genexpressionen waren von den systemischen Plasmakonzentrationen von Relaxin, Östradiol und Progesteron unabhängig.

Die Resultate legen eine Bedeutung des intratumoral exprimierten Relaxins für eine auto- oder parakrine Steuerung der MMP-Expression, die für Invasivität und Metastasierung wichtig ist, nahe. Aufgrund des mRNA-Nachweises, der Kolokalisation der Proteine von RXFP1 und MMP-2 und -9 sowie der Korrelation der Genexpression von Ligand (Relaxin), Rezeptor (RXFP1) und Effektormolekül (MMP-2) ist es wahrscheinlich, dass CMT über das Relaxin eine autonome Steuerung ihrer Invasivität vornehmen können. RXFP1 scheint dabei eine Regulationsfunktion in der Relaxinsensibilität der CMT-Zelle zuzukommen, die in Zukunft durch die Messung der RXFP1-Expressionsintensität prognostisch nutzbar sein könnte. Zudem ist RXFP1 im CMT damit auch ein möglicher Ansatzpunkt für eine neue, auf Relaxinanaloga basierende, antimetastatische Therapie, die bereits an humanen Tumorzellen und in Mausmodellen erprobt wird (FENG et al. 2007; HOSSAIN et al. 2010). Durch den Nachweis von Relaxin und RXFP1 im CMT und ihre wahrscheinliche Relevanz für die Metastasierung ergeben sich somit neue Möglichkeiten für eine exaktere Prognose und verbesserte antimetastatische Therapie von CMT sowie die Chance, den Hund als Modell für die Erforschung Relaxin basierter Therapien des humanen Brustkrebses zu nutzen.

6 Summary

Ole Lamp

Analysis of biochemical markers for diagnostics and prognosis of canine mammary tumours

Institute of Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in December 2011

59 pages, 2 publications, 1 figure, 0 tables, 176 references, 3 appendices

Keywords: dog, mammary tumour, metastasis, PCR, prognosis

Canine mammary tumours (CMT) are one of the main reasons of death in female dogs (SIMON et al. 2001). Due to its peripheral location, it is normally not the primary tumour, but its metastases, which are life-threatening as they often impair the function of vital organs, such as lung, heart or brain (CLEMENTE et al. 2010). Currently used techniques for the detection of metastasis can either barely describe invasive growth patterns or detect already existing metastases. Molecular markers to determine the metastatic potential early and reliably, before metastatic spreading has occurred, are still lacking.

The peptide hormone relaxin is well known as an inducer of matrix metalloproteinases (MMP) in numerous physiological as well as pathological situations in humans (TOO et al. 1984; UNEMORI und AMENTO 1990; PALEJWALA et al. 2001; BINDER et al. 2002; KLONISCH et al. 2007; HENNEMAN et al. 2008). MMP are key-enzymes of connective tissue remodelling which is a prerequisite for metastasis (WOODHOUSE et al. 1997). In women, the plasma relaxin concentration is a marker for metastatic breast cancer (BINDER et al. 2004). However, in dogs, the concentration of circulating relaxin seems to have no diagnostic value (SCHWEIZER 2010). But, possibly relaxin is expressed locally in the canine mammary tissue as postulated by GOLDSMITH et al. (1994) and SILVERTOWN et al. (2003) and it could therefore act as a pro-invasive and pro-metastatic factor in an auto- or paracrine manner as it does in various human tumours (KLONISCH et al. 2007).

Thus, the present study should examine the intratumoural expression of relaxin and its receptors as well as factors of connective tissue remodelling and evaluate their prognostic abilities.

In two sections of the study (LAMP et al. 2009; LAMP et al. 2011), CMT-tissue samples from n=31 bitches (LAMP et al. 2009) and n=59 bitches (LAMP et al. 2011), respectively, were analysed for their expression of relaxin, its receptors RXFP1 and RXFP2, MMP-1, -2, -3, -9 and MMP-13 as well as the oestradiol receptors ER α and ER β and the progesterone receptor (PR) using quantitative

Summary

reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR). Additionally, the plasma concentrations of the hormones relaxin, oestradiol and progesterone were tested for possible connections with the local gene expression.

In the second section of the study, the expression of relaxin and RXFP1 was also examined immunohistologically in n=9 CMT tissue samples (LAMP et al. 2011) and the prognostic value of all parameters examined was assessed by a multivariate analysis.

The expression analysis showed that CMTs are a novel site of expression of relaxin and its main receptor RXFP1 in the dog. These results were confirmed by the immunohistological examination. Moreover, the immunohistological analysis demonstrated that relaxin seems to be expressed mainly in myoepithelial cells. However, the strongest signals for RXFP1 were located in epithelial cells of the CMT, thus RXFP1 is colocalised with the expression of MMP-2 and MMP-9 reported in epithelial CMT-cells (PAPPARELLA et al. 1997; HIRAYAMA et al. 2002; PAPPARELLA et al. 2002). The quantitative expression analysis revealed correlations of expression intensities for relaxin, RXFP1 and MMP-2. The expression of RXFP1 presented as an independent marker for metastasis with a 15-fold risk increase for patients with an expression intensity above the study-specific cut-off. All local gene expressions examined were independent from systemic plasma concentrations of relaxin, oestradiol and progesterone.

The results propose an important role for intratumourally expressed relaxin as an auto- or paracrine modulator of MMP expression, which is important for invasiveness and metastasis.

Due to the mRNA detection, the protein colocalisation of RXFP1 with MMP-2 and MMP-9 as well as the correlation of gene expressions of the ligand (relaxin), the receptor (RXFP1) and the effector (MMP-2) it is highly probable that CMT can autonomously regulate their invasiveness via locally expressed relaxin.

RXFP1 seems to have a regulatory function in the relaxin responsiveness of CMT cells, which may be of prognostical use in the future. In addition, RXFP1 is also a possible target for a novel antimetastatic therapy based on relaxin analogs which has been tested in human tumour cells and mice (FENG et al. 2007; HOSSAIN et al. 2010).

The detection of relaxin and RXFP1 in the CMT and their probable relevance for metastasis could be a basis for a more precise prognosis of CMT, improved anti-metastatic therapies in the dog and the use of the dog as a model for relaxin-based therapies of human breast cancer.

7 Literaturverzeichnis

- Adham IM, Burkhardt E, Benahmed M, Engel W. Cloning of cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular leydig-cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(35):26668-72.
- Allen SW, Mahaffey EA. Canine mammary neoplasia - prognostic indicators and response to surgical therapy. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1989;25(5):540-6.
- Anand-Ivell RJK, Relan V, Balvers M, Coiffec-Dorval I, Fritsch M, Bathgate RAD et al. Expression of the insulin-like peptide 3 (INSL3) hormone-receptor (LGR8) system in the testis. *Biology of Reproduction*. 2006;74(5):945-53.
- Bani D. Relaxin: A pleiotropic hormone. *General Pharmacology*. 1997;28(1):13-22.
- Bani D, Failli P, Bello MG, Thiernemann C, Sacchi TB, Bigazzi M et al. Relaxin activates the L-arginine nitric oxide pathway in vascular smooth muscle cells in culture. *Hypertension*. 1998;31(6):1240-7.
- Bani D, Flagiello D, Poupon MF, Nistri S, Poirson-Bichat F, Bigazzi M et al. Relaxin promotes differentiation of human breast cancer cells MCF-7 transplanted into nude mice. *Virchows Archiv*. 1999;435(5):509-19.
- Bani D, Riva A, Bigazzi M, Sacchi TB. Differentiation of breast-cancer cells in-vitro is promoted by the concurrent influence of myoepithelial cells and relaxin. *British Journal of Cancer*. 1994;70(5):900-4.
- Bani G, Bigazzi M, Bani D. The effects of relaxin on the mouse mammary-gland .2. The epithelium. *Journal of Endocrinological Investigation*. 1986;9(2):145-52.
- Bani-Sacchi T, Bigazzi M, Bani D, Mannaioni PF, Masini E. Relaxin-induced increased coronary flow through stimulation of nitric oxide production. *British Journal of Pharmacology*. 1995;116(1):1589-94.
- Bathgate RAD, Samuel CS, Burazin TCD, Layfield S, Claasz AA, Reytomas IGT et al. Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene - Novel members of the relaxin peptide family. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(2):1148-57.
- Bathgate RAD, Hsueh AJW, Sherwood OD. Physiology and Molecular Biology of the Relaxin Peptide Family. In: Jimmy D. Neill, Hrsg. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3. Aufl. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 679-768.

- Bennett RG, Kharbanda KK, Tuma DJ. Inhibition of markers of hepatic stellate cell activation by the hormone relaxin. *Biochemical Pharmacology*. 2003;66(5):867-74.
- Bigazzi M, Brandi ML, Bani G, Sacchi TB. Relaxin influences the growth of MCF-7 breast-cancer-cells - mitogenic and antimitogenic action depends on peptide concentration. *Cancer*. 1992;70(3):639-43.
- Binder C, Hagemann T, Husen B, Schulz M, Einspanier A. Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by up-regulation of matrix metalloproteases. *Molecular Human Reproduction*. 2002;8(9):789-96.
- Binder C, Simon A, Binder L, Hagemann T, Schulz M, Emons G et al. Elevated concentrations of serum relaxin are associated with metastatic disease in breast cancer patients. *Breast-Cancer Research and Treatment*. 2004;87(2):157-66.
- Bostock DE. The prognosis following surgical excision of canine mammary neoplasms. *European Journal of Cancer*. 1975;11(6):389-396.
- Bostock DE. Canine and feline mammary neoplasms. *British Veterinary Journal*. 1986;142(6):506-15.
- Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR. Canine Mammary-Gland Neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1983;19(1):61-90.
- Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR. Canine mammary gland neoplasia. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1985;19:61-90.
- Bryant-Greenwood GD, Schwabe C. Human Relaxins: Chemistry and Biology. *Endocrine Reviews*. 1994;15(1):5-26.
- Büllesbach EE, Schwabe C. The trap-like relaxin-binding site of the leucine-rich G-protein-coupled receptor 7. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(14):14051-6.
- Callander GE, Thomas WG, Bathgate RAD. Prolonged RXFP1 and RXFP2 signaling can be explained by poor internalization and a lack of beta-arrestin recruitment. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2009;296(5):C1058-C1066.
- Cassali GD, Gobbi H, Malm C, Schmitt FC. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology*. 2007;18(3):191-6.

- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2003;253(1-2):269-85.
- Chang CC, Tsai MH, Liao JW, Chan JPW, Wong ML, Chang SC. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *JAVMA-Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2009;235(4):391-6.
- Chassin D, Laurent A, Janneau JL, Berger R, Bellet D. Cloning of a new member of the insulin gene superfamily (INSL4) expressed in human placenta. *Genomics*. 1995;29(2):465-70.
- Chen G, Huang JR, Tseng L. The Effect of Relaxin on Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate Concentrations in Human Endometrial Glandular Epithelial-Cells. *Biology of Reproduction*. 1988;39(3):519-25.
- Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2008;40(6-7):1362-78.
- Clemente M, Perez-Alenza MD, Pena L. Metastasis of Canine Inflammatory versus Non-Inflammatory Mammary Tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 2010;143(2-3):157-63.
- Concannon PW, McCann JP, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility Supplements*. 1989;39:3-25.
- Conklin D, Lofton-Day CE, Haldeman BA, Ching A, Whitmore TE, Lok S et al. Identification of INSL5, a new member of the insulin superfamily. *Genomics*. 1999;60(1):50-6.
- Dalrymple MB, Pflieger KDG, Eidne KA. G protein-coupled receptor dimers: Functional consequences, disease states and drug targets. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008;118(3):359-71.
- de Carvalho Papa P. Darstellung von Estradiol-17beta- und Progesteronrezeptoren im Corpus luteum der Hündin zu definierten Zeitpunkten im Östrus und Diöstrus [Dissertation med. vet.] Gießen: Justus-Liebig-Univ. Gießen; 2001.
- Donnay I, Rauis J, Devleeschouwer N, Woutersballman P, Leclercq G, Verstegen J. Comparison of estrogen and progesterone-receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 1995;56(9):1188-94.
- Dorn CR, Taylor DON, Schneide.R, Hibbard HH, Klauber MR. Survey of Animal Neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties California .2. Cancer Morbidity in Dogs and Cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute*. 1968;40(2):307-18.

- Dschietzig T, Bartsch C, Baumann G, Stangl K. RXFP1-inactive relaxin activates human glucocorticoid receptor: Further investigations into the relaxin-GR pathway. *Regulatory Peptides*. 2009;154(1-3):77-84.
- Dschietzig T, Bartsch C, Stangl V, Baumann G, Stangl K. Identification of the pregnancy hormone relaxin as glucocorticoid receptor agonist. *FASEB Journal*. 2004;18(13):1536-8.
- Dschietzig T, Richter C, Bartsch C, Laule M, Armbruster FP, Baumann G et al. The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *FASEB Journal*. 2001;15(12):2187-95.
- Du XJ, Samuel CS, Gao XM, Zhao L, Parry LJ, Tregear GW. Increased myocardial collagen and ventricular diastolic dysfunction in relaxin deficient mice: a gender-specific phenotype. *Cardiovascular Research*. 2003;57(2):395-404.
- Egenvall A, Bonnett BN, Hedhammar A, Olson P. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: II. Breed-specific age and survival patterns and relative risk for causes of death. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2005;46(3):121-36.
- Einspanier A, Bunck C, Salpigtidou P, Marten A, Fuhrmann K, Hoppen HO et al. Relaxin: ein wichtiger Graviditätsindikator bei der Hündin. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 2002;109(1):8-12.
- Einspanier A, Unemori E, Jurdzinski A, Fuhrmann K. Relaxin is supporting implantation and early pregnancy in the common marmoset monkey. *Biology of Reproduction*. 2001;64:182.
- Fei DTW, Gross MC, Lofgren JL, Moraworms M, Chen AB. Cyclic-Amp Response to Recombinant Human Relaxin by Cultured Human Endometrial Cells - A Specific and High Throughput Invitro Bioassay. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1990;170(1):214-22.
- Feng S, AgoulNIK IU, Bogatcheva NV, Kamat AA, Kwabi-Addo B, Li R et al. Relaxin promotes prostate cancer progression. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(6):1695-702.
- Fidler IJ, Brodey RS. The biological behavior of canine mammary neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1967;151(10):1311-8.
- Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE, Hurvitz AI, Black MM. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*. 1983;20(2):127-42.
- Giles RC, Kwapien RP, Geil RG, Casey HW. Mammary nodules in beagle dogs administered investigational oral-contraceptive steroids. *Journal of the National Cancer Institute*. 1978;60(6):1351-64.

- Gizinski S, Boryczko Z, Katkiewicz M, Bostedt H. Untersuchungen zur peripheren Steroidhormonkonzentration sowie zur Östrogenrezeptorendichte und Verteilung des Proliferationsmarkers Ki-67 in caninen Mammatumoren verschiedener Dignität. Tierärztliche Praxis Kleintiere. 2004;32(4):214-20.
- Gjorevski N, Nelson CM. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2011;12(9):581-93.
- Goldsmith LT, Lust G, Steinetz BG. Transmission of relaxin from lactating bitches to their offspring via suckling. Biology of Reproduction. 1994;50(2):258-65.
- Goldsmith LT, Weiss G, Palejwala S, Plant TM, Wojtczuk A, Lambert C et al. Relaxin regulation of endometrial structure and function in the rhesus monkey. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(13):4685-9.
- Habla C. Der Einfluss von Relaxin auf das Wachstum von Mammakarzinomen [Dissertation med. vet.] Leipzig: Univ. Leipzig; 2010.
- Halls ML, Bathgate RA, Summers RJ. Comparison of signaling pathways activated by the relaxin family peptide receptors, RXFP1 and RXFP2, using reporter genes. Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2007;320(1):281-90.
- Halls ML, Cooper DMF. Sub-picomolar relaxin signalling by a pre-assembled RXFP1, AKAP79, AC2, beta-arrestin 2, PDE4D3 complex. Embo Journal. 2010;29(16):2772-87.
- Hampe JF, Misdorp W. Tumors and dysplasias of the mammary-gland. Bulletin of the World Health Organization. 1974;50(1-2):111-33.
- Heeg MH, Koziolk MJ, Vasko R, Schaefer L, Sharma K, Muller GA et al. The antifibrotic effects of relaxin in human renal fibroblasts are mediated in part by inhibition of the Smad2 pathway. Kidney International. 2005;68(1):96-109.
- Hellmen E, Bergstrom R, Holmberg L, Spangberg IB, Hansson K, Lindgren A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. Veterinary Pathology. 1993;30(1):20-7.
- Henneman S, Bildt MM, Degroot J, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Relaxin stimulates MMP-2 and alpha-smooth muscle actin expression by human periodontal ligament cells. Archives of Oral Biology. 2008;53(2):161-7.

- Hirayama K, Yokota H, Onai R, Kobayashi T, Kumata T, Kihara K et al. Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. *Journal of Comparative Pathology*. 2002;127(4):249-56.
- Hisaw FL. Experimental relaxation of the pubic ligament of the guinea pig. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. 1926;23:661-3.
- Hisaw FL. Effect of relaxin on uterus of monkeys (*Macaca mulatta*) with observations on cervix + symphysis pubis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1964;89(2):141-&.
- Hombach-Klonisch S, Bialek J, Trojanowicz B, Weber E, Holzhausen HJ, Silvertown JD et al. Relaxin enhances the oncogenic potential of human thyroid carcinoma cells. *American Journal of Pathology*. 2006;169(2):617-32.
- Honscha KU, Schirmer A, Reischauer A, Schoon HA, Einspanier A, Gabel G. Expression of ABC-Transport Proteins in Canine Mammary Cancer: Consequences for Chemotherapy. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009;44:218-23.
- Hossain MA, Samuel CS, Binder C, Hewitson TD, Tregear GW, Wade JD et al. The chemically synthesized human relaxin-2 analog, B-R13/17K H2, is an RXFP1 antagonist. *Amino Acids*. 2010;39(2):409-16.
- Hsu SY, Kudo M, Chen T, Nakabayashi K, Bhalla A, van der Spek PJ et al. The three subfamilies of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors (LGR): Identification of LGR6 and LGR7 and the signaling mechanism for LGR7. *Molecular Endocrinology*. 2000;14(8):1257-71.
- Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Sherwood OD et al. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science*. 2002;295(5555):671-4.
- Hudson P, Haley J, John M, Cronk M, Crawford R, Haralambidis J et al. Structure of a genomic clone encoding biologically-active human relaxin. *Nature*. 1983;301(5901):628-31.
- Hudson P, John M, Crawford R, Haralambidis J, Scanlon D, Gorman J et al. Relaxin gene-expression on human ovaries and the predicted structure of a human preprorelaxin by analysis of cDNA clones. *Embo Journal*. 1984;3(10):2333-9.
- Illera JC, Perez-Alenza MD, Nieto A, Jimenez MA, Silvan G, Dunner S et al. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*. 2006;71(7):541-8.
- Jabara AG. Induction of canine ovarian tumours by diethylstilboestrol and progesterone. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. 1962a;40(2):139-&.

- Jabara AG. Some tissue changes in dog following stilboestrol administration. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. 1962b;40(4):293-&.
- Jain V, Raghunath M. Prognosis of canine mammary neoplasms. *Indian Veterinary Journal*. 2008;85(8):829-32.
- Kamat AA, Feng S, AgoulNIK IU, Kheradmand F, Bogatcheva NV, Coffey D et al. The role of relaxin in endometrial cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 2006;5(1):71-7.
- Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology*. 2005;133(4):246-52.
- Kawai K, Uetsuka K, Doi K, Nakayama H. The activity of matrix metalloproteinases (MMPS) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in mammary tumors of dogs and rats. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2006;68(2):105-11.
- Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, Morita H et al. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(19):7323-8.
- Kern A, Hubbard D, Amano A, Bryant-Greenwood GD. Cloning, expression and functional characterization of relaxin receptor (LGR7) splice variants from human fetal membranes. *Endocrinology*. 2007.
- Kern A, Bryant-Greenwood GD. Characterization of Relaxin Receptor (RXFP1) Desensitization and Internalization in Primary Human Decidual Cells and RXFP1-Transfected HEK293 Cells. *Endocrinology*. 2009;150(5):2419-28.
- Klonisch T, Bialek J, Radestock Y, Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S. Relaxin-like ligand-receptor systems are autocrine/paracrine effectors in tumor cells and modulate cancer progression and tissue invasiveness. In: AgoulNIK AI, Hrsg. *Relaxin and Related Peptides*. 1. Auflage. Berlin: Springer-Verlag Berlin; 2007. p. 104-118.
- Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Froehlich C, Kauffold J, Steger K, Steinetz BG et al. Canine preprorelaxin: nucleic acid sequence and localization within the canine placenta. *Biology of Reproduction*. 1999;60(3):551-7.
- Klopfleisch R, Lenze D, Hummel M, Gruber AD. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC Cancer*. 2010;10:11.

- Klopfleisch R, von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gaertner F, Gruber AD. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. *Veterinary Pathology*. 2011;48(1):98-116.
- Kohsaka T, Min G, Lukas G, Trupin S, Campbell ET, Sherwood OD. Identification of specific relaxin-binding cells in the human female. *Biology of Reproduction*. 1998;59(4):991-9.
- Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, Roh JS, Fu P, Wade JD et al. INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(35):31283-6.
- Kurzman ID, Gilbertson SR. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in veterinary medicine and surgery (Small Anim)*. 1986;1(1):25-32.
- Kwapien RP, Giles RC, Geil RG, Casey HW. Malignant mammary-tumors in beagle dogs dosed with investigational oral-contraceptive steroids. *Journal of the National Cancer Institute*. 1980;65(1):137-44.
- Lamp O, Honscha KU, Jakob J, Lamp J, Schweizer S, Reischauer A et al. Investigation of the Local Expression of the Relaxin System in Canine Mammary Tumours. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009;44:224-9.
- Lamp O, Honscha KU, Schweizer S, Heckmann A, Blaschzik S, Einspanier A. The metastatic potential of canine mammary tumours can be assessed by mRNA expression analysis of connective tissue modulators. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2011;no. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2011.00303.x
- Lekgabe ED, Kiriazis H, Zhao CX, Xu Q, Moore XL, Su YD et al. Relaxin reverses cardiac and renal fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2005;46(2):412-8.
- Lok S, Johnston DS, Conklin D, Lofton-Day CE, Adams RL, Jelmberg AC et al. Identification of INSL6, a new member of the insulin family that is expressed in the testis of the human and rat. *Biology of Reproduction*. 2000;62(6):1593-9.
- Lowndes K, Amano A, Yamamoto SY, Bryant-Greenwood GD. The human relaxin receptor (LGR7): Expression in the fetal membranes and placenta. *Placenta*. 2006;27(6-7):610-8.
- MacVean DW, Monlux AW, Anderson PS, Jr., Silberg SL, Roszel JF. Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Veterinary Pathology*. 1978;15(6):700-15.
- Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2006;11:1696-701.

- Manee-in S, Srisuwatanasagul S, Lohachit C, Sirivaidyapong S. The number of ER \pm and PR in the mammary glands of bitches with and without tumor mass using immunohistochemical assay. *Comparative Clinical Pathology*. 2009;18(3):221-7.
- Marinelli L, Gabai G, Wolfswinkel J, Mol JA. Mammary steroid metabolizing enzymes in relation to hyperplasia and tumorigenesis in the dog. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2004;92(3):167-73.
- Marquardt C, Wehrend A, Burkhardt E, Failing K, Bostedt H. Sonographic examination of mammary tumors in bitches. Part 2: Preoperative sonographic evaluation of dignity. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere*. 2005;33(1):23-6.
- Martin de Las Mulas J, Millan Y, Dios R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology*. 2005;42(2):200-12.
- Martin de Las Mulas J, Ordas J, Millan MY, Chacon F, De Lara M, Espinosa de los MA et al. Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in normal and tumoral canine mammary glands. *Veterinary Pathology*. 2004;41(3):269-72.
- Martin N, Hoftmann T, Politt E, Hoppen HO, Sohr M, Gunzel-Apel AR et al. Morphological Examination of the Corpora Lutea from Pregnant Bitches Treated with Different Abortifacient Regimes. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009;44:185-9.
- Masterson R, Hewitson TD, Kelynack K, Martic M, Parry L, Bathgate R et al. Relaxin down-regulates renal fibroblast function and promotes matrix remodelling in vitro. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2004;19(3):544-52.
- Mazella J, Tang M, Tseng L. Disparate effects of relaxin and TGF beta 1: relaxin increases, but TGF beta 1 inhibits, the relaxin receptor and the production of IGFBP-1 in human endometrial stromal/decidual cells. *Human Reproduction*. 2004;19(7):1513-8.
- Mercado-Simmen RC, Bryant-Greenwood GD, Greenwood FC. Relaxin receptor in the rat myometrium - regulation by estrogen and relaxin. *Endocrinology*. 1982;110(1):220-6.
- Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*. 2005;79(3):225-32.

- Milligan G. G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2006;11(11-12):541-9.
- Misdorp W, Hart AA. Canine mammary cancer. II. Therapy and causes of death. *Journal of Small Animal Practice*. 1979;20(7):395-404.
- Misdorp W, Hellmen E, Else RW, Lipscomb TP. *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*. 1. Aufl. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology; 1999.
- Molitoris K, Koos R. Similar to estrogen, relaxin-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in the rat uterus involves activation of the PI3K/AKT pathway, estrogen receptor alpha (ER alpha), and hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha). *Biology of Reproduction*. 2008;625.
- Mookerjee I, Solly NR, Royce SG, Tregear GW, Samuel CS, Tang MLK. Endogenous relaxin regulates collagen deposition in an animal model of allergic airway disease. *Endocrinology*. 2006;147(2):754-61.
- Morris JS, Dobson JM, Bostock DE, O'Farrell E. Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. *Veterinary Record*. 1998;142(24):656-8.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). RXFP1 relaxin/insulin-like family peptide receptor 1 [Canis lupus familiaris]. 2011 (zitiert vom 18.11.2011). <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=475479>>.
- Nguyen BT, Dessauer CW. Relaxin stimulates protein kinase C zeta translocation: Requirement for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production. *Molecular Endocrinology*. 2005;19(4):1012-23.
- Nieto A, Pena L, Perez-Alenza MD, Sanchez MA, Flores JM, Castano M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Veterinary Pathology*. 2000;37(3):239-47.
- Novosad CA. Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 2003;18(2):107-9.
- Owen LN. *TNM classification of tumours in domestic animals*. 1. Aufl. Genf: World Health Organization (WHO); 1980.
- Owen LN, Briggs MH. Contraceptive steroid toxicology in the Beagle dog and its relevance to human carcinogenicity. *Curr Med Res Opin*. 1976;4(5):309-29.

- Palejwala S, Stein DE, Weiss G, Monia BP, Tortoriello D, Goldsmith LT. Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway. *Endocrinology*. 2001;142(8):3405-13.
- Palejwala S, Tseng L, Wojtczuk A, Weiss G, Goldsmith LT. Relaxin gene and protein expression and its regulation of procollagenase and vascular endothelial growth factor in human endometrial cells. *Biology of Reproduction*. 2002;66(6):1743-8.
- Papparella S, Restucci B, Maiolino P, De VG. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary gland. *Journal of Comparative Pathology*. 1997;117(3):277-82.
- Papparella S, Restucci B, Paciello O, Maiolino P. Expression of matrix metalloprotease-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. *Journal of Comparative Pathology*. 2002;126(4):271-6.
- Perez AMD, Pena L, Del CN, Nieto AI. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*. 2000;41(7):287-91.
- Philibert JC, Snyder PW, Glickman N, Glickman LT, Knapp DW, Waters DJ. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2003;17(1):102-6.
- Pillai SB, Rockwell LC, Sherwood OD, Koos RD. Relaxin stimulates uterine edema via activation of estrogen receptors: Blockade of its effects using ICI 182,780, a specific estrogen receptor antagonist. *Endocrinology*. 1999;140(5):2426-9.
- Priester WA. Occurrence of mammary neoplasms in bitches in relation to breed, age, tumour type, and geographical region from which reported. *Journal of Small Animal Practice*. 1979;20(1):1-11.
- Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, Pena L, Lopes C, Illera JC. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2005;94(1-3):181-7.
- Radestock Y, Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S. Relaxin reduces xenograft tumour growth of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Research*. 2008;10(4):15.
- Rivera P, von Euler H. Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*. 2011;48(1):132-46.
- Rutteman GR. Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. *In Vivo*. 1990;4(1):33-40.

Rutteman GR. Mammatumoren des Hundes. In: Kessler M, Hrsg. Kleintieronkologie. Stuttgart: Enke; 2005: p. 237-248.

Rutteman GR, Misdorp W, Blankenstein MA, Vandenbrom WE. Estrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog - different receptor profile in non-malignant and malignant states. *British Journal of Cancer*. 1988;58(5):594-9.

Sacchi TB, Bani D, Brandi ML, Falchetti A, Bigazzi M. Relaxin influences growth, differentiation, and cell-cell adhesion of human breast-cancer cells in culture. *International Journal of Cancer*. 1994;57(1):129-34.

Samuel CS. Relaxin: antifibrotic properties and effects in models of disease. *Clinical Medical Research*. 2005;3(4):241-9.

Samuel CS, Hewitson TD. Relaxin in cardiovascular and renal disease. *Kidney International*. 2006;69(9):1498-502.

Samuel CS, Sakai LY, Amento EP. Relaxin regulates fibrillin 2, but not fibrillin 1, mRNA and protein expression by human dermal fibroblasts and murine fetal skin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2003;411(1):47-55.

Samuel CS, Unemori EN, Mookerjee I, Bathgate RAD, Layfield SL, Mak J et al. Relaxin modulates cardiac fibroblast proliferation, differentiation, and collagen production and reverses cardiac fibrosis in vivo. *Endocrinology*. 2004a;145(9):4125-33.

Samuel CS, Zhao CX, Bond CP, Hewitson TD, Amento EP, Summers RJ. Relaxin-1-deficient mice develop an age-related progression of renal fibrosis. *Kidney International*. 2004b;65(6):2054-64.

Schneider R, Dorn CR, Taylor DON. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute*. 1969;43(6):1249-61.

Schweizer S. Die Relaxin-Plasmakonzentration als prognostischer Marker bei Hündinnen mit Mammatumoren [Dissertation med. vet.] Leipzig: Univ. Leipzig; 2010.

Scott DJ, Fu P, Shen PJ, Gundlach A, Layfield S, Riesewijk A et al. Characterization of the rat INSL3 receptor. *Relaxin and Related Peptides: Fourth International Conference on Relaxin and Related Peptides*. 2005;1041:13-6.

Scott DJ, Layfield S, Yan Y, Sudo S, Hsueh AJW, Tregear GW et al. Characterization of novel splice variants of LGR7 and LGR8 reveals that receptor signaling is mediated by their unique low density lipoprotein class A modules. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(46):34942-54.

- Silvertown JD, Geddes BJ, Summerlee AJ. Adenovirus-mediated expression of human prorelaxin promotes the invasive potential of canine mammary cancer cells. *Endocrinology*. 2003;144(8):3683-91.
- Simon D, Goronzy P, Stephan I, MeyerLindenberg A, Aufderheide M, Nolte I. Mammary tumours in the dog: Frequency and course. *Praktische Tierarzt*. 1996;77(9):771-8.
- Simon D, Schoenrock D, Baumgartner W, Nolte I. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2006;20(5):1184-90.
- Simon D, Schoenrock D, Nolte I, Baumgartner W, Barron R, Mischke R. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Veterinary Clinical Pathology*. 2009;38(4):521-8.
- Simon D, Schönrock D, Ueberschär S, Siebert J, Nolte I. Mammatumoren des Hundes: Diagnostik und Therapie. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*. 2001;29:47-50.
- Sokolows JH. Effects of Ovariectomy on Pregnancy Maintenance in Bitch. *Laboratory Animal Science*. 1971;21(5):696-8.
- Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen AM, Langeland M et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary Comparative Oncology*. 2009;7(3):162-72.
- Sorensen KC, Newman RG, Kitchell BE, Schaeffer DJ, Siegel AM. Isolation, characterization, and expression of stromelysin-1 in primary tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 2005;66(9):1526-35.
- Steinetz BG, Bullesbach EE, Goldsmith LT, Schwabe C, Lust G. Use of synthetic canine relaxin to develop a rapid homologous radioimmunoassay. *Biology of Reproduction*. 1996;54(6):1252-60.
- Steinetz BG, Goldsmith LT, Harvey HJ, Lust G. Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy. *American Journal of Veterinary Research*. 1989;50(1):68-71.
- Steinetz BG, Goldsmith LT, Hasan SH, Lust G. Diurnal-variation of serum progesterone, but not relaxin, prolactin or estradiol-17-beta in the pregnant bitch. *Endocrinology*. 1990;127(3):1057-63.
- Steinetz BG, Goldsmith LT, Lust G. Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs. *Biology of Reproduction*. 1987;37(3):719-25.

- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2001;17:463-516.
- Stewart DR, Henzel WJ, Vandlen R. Purification and sequence determination of canine relaxin. *Journal of Protein Chemistry*. 1992;11(3):247-53.
- Stovring M, Moe L, Glattre E. A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1997;105(8):590-6.
- Summers R, Bathgate R, Ivell R, Sanborn B, Sherwood D. Relaxin family peptide receptors. IUPHAR-Database (IUPHAR-DB). 2009 (zitiert vom 2.7.2011): <<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=60>>.
- Suter PF, Carrig CB, O'Brien TR, Koller D. Radiographic Recognition of Primary and Metastatic Pulmonary Neoplasms of Dogs and Cats1. *Veterinary Radiology*. 1974;15(2):3-24.
- Svendsen AM, Vrecl M, Ellis TM, Heding A, Kristensen JB, Wade JD et al. Cooperative binding of insulin-like peptide 3 to a dimeric relaxin family peptide receptor 2. *Endocrinology*. 2008a;149(3):1113-20.
- Svendsen AM, Zalesko A, Konig J, Vrecl M, Heding A, Kristensen JB et al. Negative cooperativity in H2 relaxin binding to a dimeric relaxin family peptide receptor 1. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2008b;296(1-2):10-7.
- Tashima LS, Mazoujian G, Bryant-Greenwood GD. Human relaxins in normal, benign and neoplastic breast tissue. *J Mol Endocrinol*. 1994;12(3):351-64.
- Tassani-Prell M. Bildgebende Verfahren in der Onkologie. In: Kessler M, Hrsg. *Kleintieronkologie*. Stuttgart: Enke; 2005: p. 73-92.
- Taylor GN, Shabestari L, Williams J, Mays CW, Angus W, Mcfarland S. Mammary Neoplasia in A Closed Beagle Colony. *Cancer Research*. 1976;36(8):2740-3.
- Thompson VC, Morris TGW, Cochrane DR, Cavanagh J, Wafa LA, Hamilton T et al. Relaxin becomes upregulated during prostate cancer progression to androgen independence and is negatively regulated by androgens. *Prostate*. 2006;66(16):1698-709.
- Too CKL, Bryantgreenwood GD, Greenwood FC. Relaxin increases the release of plaminogen-activator, collagenase, and proteoglycanase from rat granulosa-cells invitro. *Endocrinology*. 1984;115(3):1043-50.

- Tsutsui T, Stewart DR. Determination of the source of relaxin immunoreactivity during pregnancy in the dog. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1991;53(6):1025-9.
- Unemori EN, Amento EP. Relaxin modulates synthesis and secretion of procollagenase and collagen by human dermal fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(18):10681-5.
- Unemori EN, Erikson ME, Rocco SE, Sutherland KM, Parsell DA, Mak J et al. Relaxin stimulates expression of vascular endothelial growth factor in normal human endometrial cells in vitro and is associated with menometrorrhagia in women. *Human Reproduction*. 1999;14(3):800-6.
- Unemori EN, Pickford LB, Salles AL, Piercy CE, Grove BH, Erikson ME et al. Relaxin induces an extracellular matrix-degrading phenotype in human lung fibroblasts in vitro and inhibits lung fibrosis in a murine model in vivo. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;98(12):2739-45.
- Vinall RL, Tepper CG, Shi XB, Xue LA, Gandour-Edwards R, White RWV. The R273H p53 mutation can facilitate the androgen-independent growth of LNCaP by a mechanism that involves H2 relaxin and its cognate receptor LGR7. *Oncogene*. 2006;25(14):2082-93.
- Vinothini G, Balachandran C, Nagini S. Evaluation of Molecular Markers in Canine Mammary Tumors: Correlation With Histological Grading. *Oncology Research*. 2009;18(5-6):193-201.
- Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Development*. 2000;14(17):2123-33.
- Wilkinson TN, Speed TP, Tregear GW, Bathgate RA. Evolution of the relaxin-like peptide family. *Bmc Evolutionary Biology*. 2005;5.
- Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer*. 1997;80(8):1529-37.
- Yan W, Chen J, Wiley AA, Crean-Harris BD, Bartol FF, Bagnell CA. Relaxin (RLX) and estrogen affect estrogen receptor alpha, vascular endothelial growth factor, and RLX receptor expression in the neonatal porcine uterus and cervix. *Reproduction*. 2008;135(5):705-12.
- Yao LJ, Cooke PS, Meling DD, Shanks RD, Jameson JL, Sherwood OD. The Effect of Relaxin on Cell Proliferation in Mouse Cervix Requires Estrogen Receptor alpha Binding to Estrogen Response Elements in Stromal Cells. *Endocrinology*. 2010;151(6):2811-8.
- Yokota H, Kumata T, Taketaba S, Kobayashi T, Moue H, Taniyama H et al. High expression of 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) in canine mammary adenocarcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001;1568(1):7-12.

Literaturverzeichnis

Zhang Q, Liu SH, Erikson M, Lewis M, Unemori E. Relaxin activates the MAP kinase pathway in human endometrial stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2002;85(3):536-44.

8 Anhang

8.1 Abstract zu einem Vortrag auf dem 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Wien, 9.-11. Juli 2008

Investigation of the local expression of the relaxin-system in canine mammary tumors

Ole Lamp¹, Kerstin U. Honscha², Matthias Ebert¹, Jacqueline Jakob¹, Julika Lamp¹, Stephan Schweizer³, Anne Reischauer⁴, Sylvia Blaschzik³, Almuth Einspanier¹

¹Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany, Tel. 0049-341-9738100, Fax 0049-341-9738119; ²Veterinär-Physiologisches Institut, Universität Leipzig; ³Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig; ⁴Institut für Veterinär-Pathologie, Universität Leipzig

Introduction - New functions for the peptide hormone relaxin-2 (RLX-2) have been described in terms of remodulating the connective tissue, suggesting RLX-2 as an important factor for tumor cell invasion, while there is a local increase of RLX-2 expression in human neoplastic breast tissue . RLX-2 can enhance the in-vitro invasiveness of human breast cancer cell lines and higher RLX-2 levels in plasma are associated with metastatic disease as well as shorter overall survival in women. Furthermore, RLX-2 induces matrix metalloproteinases (MMPs) as potent modulators of the intercellular matrix, which also seem to play a role in canine mammary tumors (YOKOTA et al. 2001; HIRAYAMA et al. 2002).

Objectives - Therefore, the aim of the present study was to investigate the expression of the RLX-2-system (RLX-2 and RLX-2 receptor (RXFP-1)) in tumors of the mammary gland of bitches with extreme plasma RLX-2-levels related to clinical parameters and local expression of three MMPs.

Materials and Methods - Bitches with mammary tumors were selected due to their extremely high (group 1) or low (group 2) levels of plasma RLX-2 at their first surgical therapy. Collected tumor tissue was divided and stored in paraformaldehyd for histology as well as liquid nitrogen for molecular biology. 15 tissue samples within group 1 (RLX-2 levels ranging from 2.703 to 38.054 ng/ml plasma) were analyzed while group 2 (RLX-2 levels ranging from 0.000 to 0.190 ng/ml plasma) contributed 16 tissue samples. Specimens for molecular biology examination were analyzed for local expression of RLX-2, RXFP-1 and MMP2, 9 and 13 by Real-time-PCR. First strand cDNA synthesis was performed under identical conditions for all samples. Acquired values from Real-time-PCR were normalized for the 18S content of every specimen before statistical revision.

Results - Expression analysis demonstrated strong expression of RLX-2, RXFP-1 and MMP2, 9 and 13 in all samples in both groups. Statistical investigation of each parameter revealed no difference between the two groups. The comparative investigation of both groups according to one-year-survival, recidivation (6 months after first surgical treatment), radiologically detectable lung metastases (6 months after first surgical treatment) or histologically assessed dignity did show one significant difference among the investigated parameters RLX-2, RXFP-1 and MMP2, 9 and 13: In group 1 bitches with lung metastases (n=5) had a lower expression of MMP9 than bitches without (n=8) (p=0.045). Within group 2 there were significant positive correlations between the local expression of RLX-2 and RXFP-1 (p=0.001), between RLX-2 and MMP2 (p=0.041) as well as between RXFP-1 and MMP2 (p=0.006) in the tumor tissue. There was also a significant positive correlation between plasma RLX-2 and RXFP-1 (p=0.028). Whereas in group 1 there was only one significant correlation between MMP9 and MMP13 expression (p=0.038).

In summary, the genes of the analyzed factors, which are supposed to be involved in tissue remodulation, are expressed in canine mammary tumors. So far the plasma RLX-2 has no direct influence on the absolute level of expression among the observed parameters. However, the correlation between MMP 9 and 13 expression under the influence of high plasma RLX-2 versus the correlation between MMP2 expression and the RLX-2-system in the low plasma RLX-2 group suggests different stages of tumor development (e.g. early stage of cancer development, tumor differentiation), which needs to be clarified by further histological analysis of tumor differentiation and invasion.

This study is granted by Studienstiftung des deutschen Volkes (O.Lamp), Gesellschaft für kynologische Forschung GKF (A.Einspanier/S.Blaschzik) and Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG (HO 2512/1-1; K.Honscha).

8.2 Abstract zu einem Vortrag auf der 18. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie, Leipzig, 9. und 10. März 2008

Biochemische Untersuchungen zu Diagnostik und Prognose von Mammatumoren bei der Hündin

Ole Lamp^{*1}, Stephan Schweizer², Julika Lamp¹, Kerstin U. Honscha³, Matthias Ebert¹, Jaqueline Jakob¹, Anne Reischauer⁴, Sylvia Blaschzik², Almuth Einspanier¹

¹Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Leipzig; ²Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig; ³Veterinär-Physiologisches Institut, Universität Leipzig; ⁴Institut für Veterinär-Pathologie, Universität Leipzig

In den letzten Jahren konnte Relaxin (RLX) als zusätzlicher prognostischer Marker bei der Brustkrebserkrankung der Frau etabliert werden (Binder *et al.*, 2004). Im Rahmen eines Kooperationsprojektes sollte die Bedeutung von lokalem und systemischem RLX für den caninen Mammatumor überprüft werden.

Material & Methoden: Bei 86 Hündinnen wurden im Rahmen einer Mammatumor-Operation Tumorgewebeproben entnommen, die Patienten zwischen 24 und 36 Monate beobachtet und regelmäßig entnommene Blutproben auf RLX, Östradiol und Progesteron untersucht. Hündinnen im Stadium 4 gemäß TNM-Schema der WHO wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Gewebeproben wurden pathohistologisch untersucht. Für eine nach dem Relaxinspiegel zum Zeitpunkt der ersten OP ausgewählte Stichprobe von 21 Patienten (Gruppe RLX-niedrig: n = 11, Relaxin von 0,000 bis 0,190 ng/ml Heparinplasma; Gruppe RLX-hoch: n = 10, Relaxin von 2,703 bis 38,054 ng/ml Heparinplasma) wurde mittels RT-PCR die Expression von RLX untersucht.

Ergebnisse: Die Hündinnen gehörten verschiedenen Rassen (Mischlinge, Deutsche Schäferhunde, Yorkshire Terrier, Dackel) mit einem Durchschnittsalter von 9,7 Jahren an. 81,2% waren zum Zeitpunkt der ersten Operation nicht kastriert. Maligne Mammatumoren waren in 85,0% der entnommenen Mammaleisten nachweisbar. Es bestanden keine signifikanten Korrelationen des Plasma-RLX-Spiegels mit den Parametern Dignität, Größe, Stadium, Lymphknoten- oder Lungenmetastasen. Bislang zeigen 30 von 31 (96,8%) der untersuchten Tumorgewebeproben eine deutliche Expression von RLX, allerdings ist die RLX-Expression in malignen Tumoren tendenziell stärker.

Schlussfolgerungen: Im Plasma gemessenes RLX scheint sich aufgrund der bisherigen Beobachtungen nicht als prognostischer Marker bei caninen Mammatumoren zu eignen. Jedoch findet sich eine lokal erhöhte RLX-Expression in malignen Tumoren, die zukünftig gegen andere Remodulierungsfaktoren abzugleichen ist.

O. Lamp erhält ein Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes.

Anhang

Die Studie wurde finanziell gefördert von der Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung, GKF und der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG (HO 2512/1-1)

Literatur:

1. Binder C, Simon A, Binder L, Hagemann T, Schulz M, Emons G, *et al.* (2004) Elevated concentrations of serum relaxin are associated with metastatic disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 87:157-166.

*OLamp@vetmed.uni-leipzig.de

8.3 Abstract zu einem Poster, vorgestellt auf dem 7. Leipzig Research Festival for Life Sciences, Leipzig, 12. Dezember 2008

Analysis of hormones and factors for connective tissue remodelling in canine mammary tumours

Ole Lamp¹, Kerstin U. Honscha², Jacqueline Jakob¹, Julika Lamp¹, Stephan Schweizer³, Anne Reischauer⁴, Anke Hahn¹, Janine Volkery¹, Jutta Gottschalk¹, Matthias Ebert¹, Sven Rothmund⁵, Sylvia Blaschzik³ and Almuth Einspanier¹

¹Institute of Physiological Chemistry, ²Institute of Physiology, ³Department of Small Animal Medicine, ⁴Institute of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Germany; ⁵IZKF, University of Leipzig, Germany

Connective tissue remodelling is a prerequisite for invasiveness and angiogenesis, which are crucial processes in the progression of canine mammary tumours (CMT). Various factors, such as matrix metalloproteinases (MMP), steroid hormones and relaxin are well known to alter extracellular matrix in different tissues, including human breast cancer.

In the first part of the present study levels of RLX, oestradiol and progesterone from plasma samples of bitches with CMT were compared with clinical and survival data to investigate the predictive value of these hormones. In the second part, the relative gene expressions of RLX, RXFP1 and MMP2, 9 and 13 were examined by real-time RT-PCR in 31 CMT-samples. Finally, relationships between systemic plasma RLX and the observed local gene expressions were analysed for the first time in the bitch. Comparison of all hormone levels in 93 bitches in terms of benign or malignant nature of the CMT, lung metastases, recidivation and 12-months survival discovered no significances, suggesting that these hormones have no prognostic impact. Furthermore, the expressions of RLX, RXFP1 and MMP were independent from plasma RLX, but expressions of local RLX and RXFP1 showed a strong correlation ($p=0.00004$, $r=0.671$) as well as RXFP1 and MMP2 ($p=0.009$, $r=0.463$), indicating towards a significant role of the locally produced RLX in CMT pathogenesis as an inducer of connective tissue remodelling.

This study is granted by Studienstiftung des deutschen Volkes (O.Lamp), Gesellschaft für kynologische Forschung GKF (A.Einspanier/S.Blaschzik) and Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG (HO 2512/1-1; K.Honscha).

Danksagung

Ich danke der Universität Leipzig, der Gesellschaft für kynologische Forschung, sowie der Studienstiftung des deutschen Volkes für die Finanzierung dieser Arbeit.

Frau Professor Einspanier danke ich herzlich für die ausgesprochen gute Betreuung während der gesamten Promotion, in der sie immer ein offenes Ohr und viele gute Ratschläge für mich hatte.

Für die Überlassung von mRNA-Proben, die methodische Starthilfe und die vielen angeregten Fachdiskussionen danke ich sehr Dr. Kerstin Honscha.

Dr. Stephan Schweizer danke ich für seine Sammlung von Tumorgewebeproben und klinischen Patientendaten, die die Basis dieser Arbeit sind.

Für die unermüdliche und stets gut gelaunte technische Unterstützung bei der PCR und Immunhistologie danke ich Jacqueline Jakob, Susanne Tätzner und Marion Sohr.

Für die geduldige Analyse der vielen Plasmaproben in ungezählten Hormonassays danke ich Dr. Jutta Gottschalk, Giesela Lochmann, Dr. Anke Hahn, Susanne Troll, Janine Volkery, Frau Nestler und Susanne Tätzner.

Dr. Anne Heckmann danke ich für die Hilfe bei der Histopathologie und ihr pathologisches Know-How sowie die konstruktive Begleitung der beiden gemeinsamen Paper.

Ich danke allen an dem Leipziger Kooperationsprojekt zum caninen Mammatumoren beteiligten Instituten und ihren Mitarbeitern.

Meiner Schwiegermutter, Maren Jändling, danke ich für die geduldige Durchsicht des gesamten Manuskriptes und meiner Mutter danke ich für Ihren Anteil an der Manuskriptkorrektur.

Für die Hilfe bei der Erstellung der Statistik bedanke ich mich bei Frau Dr. Ziepert aus dem Institut für medizinische Informatik und Epidemiologie.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institutes für die vielen schönen Jahre und den gemeinsamen Spaß bei der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer darin bestärkt haben meine Ziele mit vollem Einsatz zu verfolgen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Frau, die oft auf mich verzichten musste, für Ihre unendliche Geduld und Toleranz, wenn ich mal wieder ins Labor oder an den Schreibtisch verschwunden bin sowie für ihre histologischen Auswertungen.